

# LABORWELT

Nr. 1/2010 – 11. Jahrgang

## RNA-Interferenz & Co.

Unbekannter Regulations-  
Mechanismus: microRNAs  
als epigenetischer Schalter

**Neu:** Wissenschaftler  
testen Geräte und Tools –  
der SOLID 3+ Sequencer

Extrazelluläre Produktion  
von synthetischen  
RNA-Aptamer-Wirkstoffen



Marktübersicht:  
Proteinexpression



## VOM ZENTRALLABOR IN IHR LABOR.

Das NEUE easyCyte™ 8HT-System



**KOMPLETT** – Die erste Komplettlösung in Form eines Tisch-Durchflusszytometers der Welt.

**OPTIMIERT** – Multiparametrische Kits und Untersuchungen.

**INTUITIV** – Software- und Analysepakete.

**LEISTUNGSSTARK** – Innovative Guava®-Technologie.

**PREISGÜNSTIG** – Passt auf Ihren Labortisch und in Ihr Budget.

### Millipore bringt die Leistung der Durchflusszytometrie auf Ihren Labortisch.

Stellen Sie sich vor, die komplexesten Untersuchungen direkt von Ihrem Labortisch aus durchführen zu können. Kein Zentrallabor. Keine externe Fachkenntnis nötig. Millipores integrierte Instrumente, Testsätze, Software und unser Service bieten Ihnen eine Komplettlösung, die Ihnen das Leben leicht macht.

### ADVANCING LIFE SCIENCE TOGETHER® Forschung. Entwicklung. Produktion.

Millipore und Advancing Life Science Together sind eingetragene Marken der Millipore Corporation.  
Guava ist eine eingetragene Marke von Guava Technologies, Inc.  
Das Millipore-Logo ist eine Marke der Millipore Corporation.  
easyCyte ist eine Marke von Guava Technologies, Inc.  
©2010 Millipore Corporation. Alle Rechte vorbehalten.



Stellen Sie auf Guava um unter  
[www.millipore.com/flowcytometryL](http://www.millipore.com/flowcytometryL)

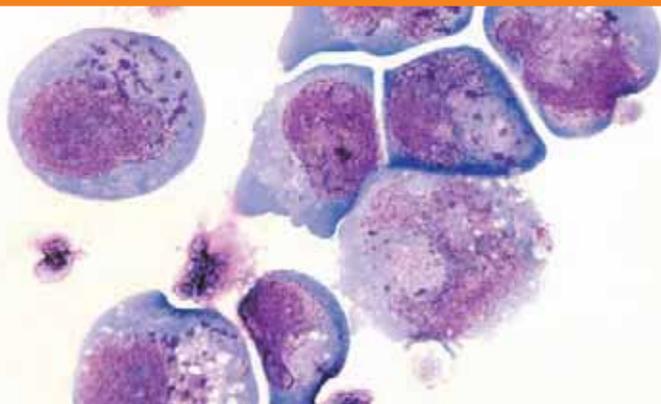
# RNAi & Testberichte

Mit inhaltlichem Zuwachs startet LABORWELT ins neue Jahr. Neben dem aktuellen Methodenfokus „RNA-Interferenz & Co.“ gibt es ab sofort in jeder Ausgabe einen Methodentest, in dem Wissenschaftler für Wissenschaftler die Stärken und Schwächen von Methoden, Geräten und Kits beleuchten. Den Auftakt machen Forscher des Max-Planck-Instituts für molekulare Genetik (vgl. Seite 8), an dem deutschlandweit die meisten Next-Generation-Sequencer stehen. Naheliegender also, die Experten ein solches System durchleuchten zu lassen: Für welche Applikationen eignet es sich, wo sind die erfolgskritischen Schritte, wovon lässt man besser die Finger? Getan haben sie dies für das System mit dem derzeit höchsten Durchsatz aller Sequencing-Maschinen, dem SOLiD von ABI bzw. Life Technologies. Zudem starten mit dieser Ausgabe zusätzlich die Rubriken Kongresswelt („Biodefense-Tagung“, vgl. Seite 35), Karrierewelt (England – offen für alternative Karrierewege“ (vgl. Seite 37) und Paperwelt (vgl. Seite 4), in denen Meetings, Berufswege und interessante Paper im Vordergrund stehen. Wir freuen uns, wenn Sie die neuen Angebote aktiv mitgestalten, uns kontaktieren, wenn Sie auf besonders interessante Meetings fahren und darüber berichten oder karriererelevante Informationen an junge Wissenschaftler weitergeben möchten. Ihre Vorschläge dazu sind hochwillkommen.

Daneben haben wir versucht, interessante Forschungsergebnisse und Methoden auf dem Gebiet der RNA-Technologien einzufangen. Aptamere etwa versprechen Antikörper-ähnliche Bindungsspezifitäten, können bisher aber nur mit hohem Aufwand in größeren Mengen hergestellt werden. Einen Ausweg weist Yo Kikuchi mit neu etablierten Produktionsorganismen (vgl. S. 6). MicroRNA-Schalter scheinen zudem die Metastasierung maßgeblich zu beeinflussen (vgl. S. 11) sowie als Diagnostika vielversprechend (vgl. S. 33). Wie siRNAs die Zellmigration beeinflussen (vgl. Seite 17), zeitlich synchronisierte *C. elegans*-Entwicklungsstadien mit Hilfe der RNA-Interferenz genomweit untersucht werden können (vgl. S. 22) und sich humane Influenza-Targets finden lassen (vgl. S. 26), regulatorische RNAs bioinformatisch aufgespürt (vgl. Seite 29) und ihre Wirkungen modelliert werden können (vgl. Seite 31), lesen Sie in dieser Themenausgabe. Über Ihr Feedback zu den neuen Rubriken und unseren Inhalten freuen wir uns – laborwelt@biocom.de.

Thomas Gabrielczyk

## In diesem Heft



## Marktübersicht: Proteinexpressions-Kits

Jedes Labor braucht sie, und entsprechend groß ist das Angebot. Proteinexpression-Kits gibt es als zellfreie Systeme, bakterielle, die aber Inclusion Bodies bilden (vgl. Foto), oder aber Systeme die spezifische posttranslationale Modifikationen gestatten. Den aktuellen Stand der Produktentwicklung präsentieren die Anbieter ab Seite 38.

## Inhalt

- Paperwelt** Highlight des Monats
- 4 **miRNA-induzierte DNA-Methylierung: ein neues Regulationsprinzip**  
Prof. Dr. Ralf Reski, Universität Freiburg
- Blitzlicht** Synthetische Aptamere
- 6 **Produktion definierter RNAs im Kulturüberstand von Bakterien**  
Prof. Dr. Yo Kikuchi, Toyohashi University of Technology, Japan
-  **Titel: RNA-Interferenz & Co.**  
Die systematische Hemmung der Proteinexpression mittels RNA-Interferenz zur Funktionsvalidierung von Genen nutzen Berliner Forscher zur Suche nach Grippe-Targets (vgl. Seite 26).  
Foto: © Nicolle Rager Fuller, National Science Foundation
- Testwelt** Next-Generation-Sequencing
- 8 **Bewertung der SOLiD-Sequenzierung aus der Nutzerperspektive**  
Dr. Andreas Dahl et al., Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin
- Blitzlicht** microRNAs
- 11 **Die Rolle ZEB1-regulierter microRNAs in der Metastasenentstehung**  
Jörg Schubert, Prof. Dr. Thomas Brabletz et al., Universitätsklinikum Freiburg
- Blitzlicht** Nukleinsäure-Reassoziaton
- 15 **Kalibrierte Diversitätsbestimmung von Nukleinsäurebanken**  
Tanja Schütze, Dr. Jörn Glöckler et al., FU Berlin, MPI für molekulare Genetik
- Blitzlicht** Zellmigration
- 17 **Echtzeitmonitoring des Gene Silencings von Zellmigrationsschaltern**  
Dr. Markus Greiner et al., Universität des Saarlandes, Homburg
- Blitzlicht** Genomweite Studien
- 20 **Automatisiertes Sortieren embryonaler C.elegans-Stadien**  
Marlon Stoeckius, Berlin Institute for Medical Systems Biology, MDC
- Blitzlicht** Krebsforschung
- 23 **Screening von Wirkstoff- und Signalweg-Interaktionen**  
Dr. Daniel Gilbert et al., DKFZ und Universität Heidelberg
- Wissenschaft** siRNA-Targetscreening
- 26 **RNAi-Screens in der Pathogenomforschung**  
Dr. Peter Braun et al., Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin
- Report** Bioinformatik
- 29 **Identifikation von Zielmolekülen kleiner regulatorischer RNAs**  
Dr. Rolf Backofen, Institut für Bioinformatik, Universität Freiburg
- Blitzlicht** Life Sciences-IT
- 31 **Computerprogramme zur Modellierung genregulatorischer Netze**  
Dr. Hendrik Hache et al., MPI für molekulare Genetik, Berlin
- Blitzlicht** miRNA-Profilng
- 33 **microRNA-Profile als Diagnosemethode**  
Dr. Andreas Keller et al., febit group, Heidelberg
- 35 **Kongresswelt**
- 37 **Karrierewelt**
- 42 **Stellenmarkt**
- 48 **Produktwelt**
- 49 **Termine, Ausblick/ Impressum**

# MicroRNA-induzierte DNA-Methylierung – ein neues Regulationsprinzip

Basel Khraiwesh, M. Asif Arif, Gotelinde Seumel, Stephan Ossowski, Detlef Weigel, Ralf Reski\* und Wolfgang Frank\*; (2010) Transcriptional control of gene expression by microRNAs. Cell 140, 111-122.

Dass microRNAs mit langen RNAs, besonders mRNAs, wechselwirken und so die Genexpression posttranskriptionell regulieren, war bekannt. Die amerikanischen Biologen Mello und Fire erhielten für diese Entdeckung am Wurm *C. elegans* 2006 den Nobelpreis. Dass miRNAs aber auch direkt mit DNA wechselwirken können und so beeinflussen, ob ein Gen überhaupt abgelesen wird, hat Anfang Januar erstmals eine Gruppe um Prof. Dr. Ralf Reski und PD Dr. Wolfgang Frank (Universität Freiburg) sowie Prof. Dr. Detlef Weigel (MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen) gezeigt. Im Moos *Physcomitrella patens* erzeugten sie durch homologe Rekombination Nullmutanten für das DICER-Like 1b-Protein. Trotz Mutation reiften in den Knock-out-Moosen genau wie im Wildtyp miRNAs heran, doch deren Ziel-RNAs wurden nicht mehr zerschnitten. Gleichwohl waren die Mengen dieser Ziel-RNAs in den Mutanten verringert statt erhöht. Dies lag daran, dass speziell die Gene, die die Ziel-RNAs kodieren, in den genetisch veränderten Moosen – aber nicht im Wildtyp – methyliert vorlagen. Sie fanden, dass das Mengenverhältnis von miRNA zu Ziel-RNA dieses epigenetische Gene Silencing auslöst. Der vermutlich konservierte Mechanismus könnte immer dann eine Rolle spielen, wenn eine schnelle Reaktion auf sich ändernde Umweltbedingungen gefragt ist. Im Wildtyp-Moos brachte auch das Stresshormon Abscisinsäure (ABA) die Genexpression epigenetisch zum Schweigen.

## Laborwelt:

Wie kam Ihnen die Idee zu der Studie und was war Ihre Arbeitshypothese?

## Reski:

DICER-Proteine sind zentral für die RNA-Interferenz (RNAi). Während Tiere und der Mensch in der Regel nur ein Gen haben, das für ein DICER-Protein kodiert, besitzen die meisten Pflanzen davon vier verschiedene. Wir erhofften uns durch die Analyse der einzelnen Moosgene ein genaueres Verständnis der vielfältigen Funktionen dieses Schlüsselproteins. Unsere Arbeitshypothese, die sich dann ja auch bestätigt hat, war, dass wir die einzelnen verschiedenen Funktionen, die DICER ausüben kann, im Moos besser als im Menschen oder im Wurm analysieren können.

## Laborwelt:

Wie haben Sie das untersucht?

## Reski:

In *Physcomitrella* kann man ähnlich effizient wie in der Hefe gezielt einzelne Gene durch das sogenannte *gene targeting* mutieren. In den meisten Höheren Eukaryoten geht dies nicht. Eine Ausnahme sind embryonale Stammzellen der Maus, die zur Herstellung von Knockout-Mäusen eingesetzt werden. Während es sehr lange dauert, eine K.o.-Maus herzustellen, ist es sehr viel einfacher, schneller und preiswerter ein K.o.-Moos herzustellen. Mit diesem Ansatz der Reversen Genetik lässt

sich direkt die Funktion der untersuchten Gene ermitteln. Anders als in der klassischen Genetik fängt man hier bei einer Gensequenz an und sucht nach deren Funktion. Bei Organismen, in denen das *gene targeting* nicht funktioniert, wie etwa dem Fadenwurm *C. elegans*, wird RNAi eingesetzt, um die Transkriptmengen der zu untersuchenden Gene herunterzuregulieren. Dieser experimentelle Ansatz funktioniert aber natürlich nicht bei dem für die RNAi zentralen Enzym DICER. Dazu muss man schon wie im Moos das Gen direkt ausschalten können.

## Laborwelt:

Wo liegt die biologische Relevanz Ihrer Ergebnisse?

## Reski:

Wir beschreiben eine bisher unbekannte und für die normale Entwicklung zentrale Methode der Genregulation, die vermutlich nicht nur in Pflanzen, sondern auch im Menschen vorkommt und hier auch bei wichtigen Krankheiten eine Rolle spielen kann. Die von uns gezeigte Verbindung von Umwelteinflüssen und Epigenetik rüttelt an einem zentralen Dogma der Biologie, das besagt, dass Umwelteinflüsse nur über DNA-Mutationen genetisch wirksam werden können. Die neuen Erkenntnisse entschärfen also den Streit zwischen Darwin und Lamarck, weil sie zeigen, dass jeder jeweils nur eine Seite derselben Medaille betrachtet hat.



Prof. Dr. Ralf Reski (51) entwickelte das Moos *Physcomitrella* zu einem Modellsystem in Grundlagenforschung und Biotechnologie. Seine Forschungsinteressen gelten der Systembiologie und der Synthetischen Biologie. Er begann seinen wissenschaftlichen Weg an der Universität Hamburg, wo er 1990 promovierte und 1994 habilitierte. Die DFG verlieh Reski 1996 ein Heisenberg-Stipendium. Von Ruf in- und ausländischer Universitäten nahm Reski 1998 den auf einen Lehrstuhl an der Universität Freiburg an. Dort begann er eine große Kooperation mit der BASF zur funktionellen Genomanalyse und gründete die Firma greenovation, die sich auf die Produktion komplexer Biopharmazeutika spezialisierte. Der in zahlreichen Gremien tätige Pflanzenbiotechnologe lehrt auch an der École supérieure de biotechnologie Strasbourg (ESBS) und forscht derzeit federführend in den Exzellenzinitiativen bioss, SGBM und FRISYS.

## Laborwelt:

Welche Modellvorstellung stützen Ihre Ergebnisse und wie geht es weiter?

## Reski:

Seit Neuestem ist aus Tierversuchen bekannt, dass intensiver Stress die Methylierung von bestimmten Genen in Nervenzellen verändert und so vermutlich psychische Krankheiten wie Depressionen auslöst. Das erinnert stark an unsere Befunde, dass das Stresshormon ABA im genetisch nicht veränderten Moos die Methylierung von Genen auslöst, die für miRNA-Targets kodieren, und sie damit verstummen lässt. Wir glauben, dass unsere Arbeit ein Schlüssel für das mechanistische Verständnis des Zusammenhanges zwischen Umwelt und Epigenetik nicht nur beim Moos, sondern auch beim Mensch sein kann. Das muss jetzt wissenschaftlich exakt an Tieren und dem Menschen bewiesen werden.



HUMAN HEALTH

ENVIRONMENTAL HEALTH

# NEN RADIOCHEMICALS 50 YEARS AND COUNTING

GLOBAL  
DELIVERY

MADE IN  
THE USA

CATALOG  
AND  
CUSTOM\*

TRUSTED  
NENSURE  
PACKAGING

© 2009 PerkinElmer, Inc. 400169\_01. All trademarks or registered trademarks are the property of PerkinElmer, Inc. and/or its subsidiaries.



This is your home for NEN® radiochemicals and radionuclides. Made in the USA and delivered around the globe, our NEN radiochemicals arrive safely in our exclusive NENSure™ packaging. Also, with over fifty years of experience in labeling technologies, we can label virtually any biomolecule. Every day, we prove our commitment to you with reliable performance, dependable product availability and proven leadership. Visit us online to order custom, catalog and countless other radiometric products.

[www.perkinelmer.com/nenradiochemicals](http://www.perkinelmer.com/nenradiochemicals)

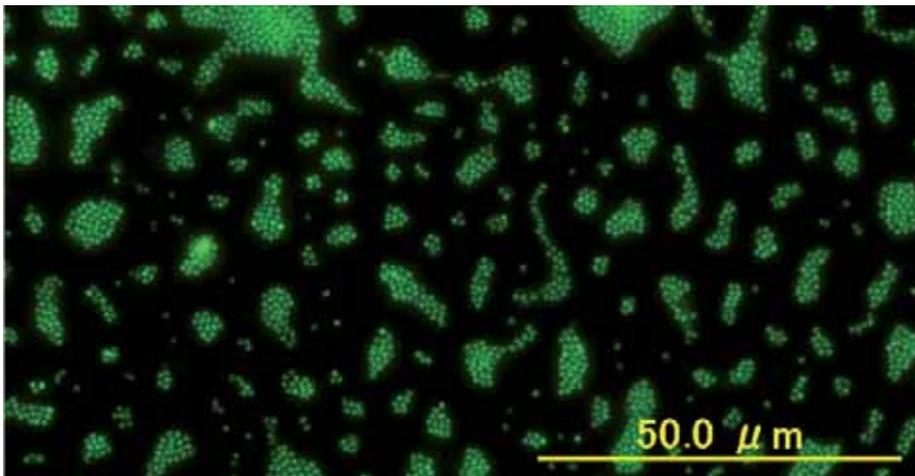
\*GMP Radiosynthesis services available. Visit [www.perkinelmer.com/customsynthesis](http://www.perkinelmer.com/customsynthesis) to learn more.

  
**PerkinElmer®**  
For the Better

# Produktion definierter RNAs im Kulturüberstand von Bakterien

Yo Kikuchi, Hiromichi Suzuki, and So Umekage, Department of Environmental & Life Sciences, Toyohashi University of Technology, Toyohashi, Japan

RNAs haben sich zu den Hauptakteuren der aktuellen Biologie entwickelt. Natürlich vorkommende microRNAs, die künstlich hergestellten siRNAs, doppelsträngige RNAs (dsRNAs) sowie die Ribozyme fungieren als Regulatoren der Genexpression. Dazu kommen experimentell aus RNA-Zufalls-mischungen selektierte RNA-Aptamere als biologisch funktionelle Moleküle, die über die Fähigkeit verfügen, jeweils spezifisch an ein definiertes Zielmolekül binden zu können. All diese RNAs sind potentielle RNA-Arzneimittelkandidaten. In diesem Zusammenhang werden dringend Verfahren benötigt, die die effiziente Gewinnung einheitlicher RNA-Moleküle gestatten. Derzeit werden diese RNAs durch *in vitro*-Transkription oder chemische Synthese gewonnen. Allerdings sind diese Verfahren teuer, arbeitsintensiv und vor allem nicht geeignet, große Mengen herzustellen. Für die RNA-Herstellung im Großmaßstab erscheint die mikrobielle *in vivo*-Produktion am besten geeignet. Ein unlängst vorgeschlagenes mikrobielles *in vivo*-Produktionsverfahren nutzt das marine phototrophe Bakterium *Rhodovulum sulfidophilum*. Dabei wird die RNA nicht in den Zellen, sondern in der Kulturbrühe hergestellt, denn das Bakterium stellt in der Natur Nukleinsäuren extrazellulär her



**Abb 1:** Mikroskopische Aufnahme von *Rhodovulum sulfidophilum*, angefärbt mit SYBR Green I. Bakterien-Flocken sind deutlich sichtbar. Details siehe Text

Erst kürzlich wurde ein RNA-Aptamer-Wirkstoff entwickelt, der dem Abbau der Makula durch spezifische Hemmung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF; Vascular Endothelial Growth Factor) entgegenwirkt<sup>1</sup>. Bei der Herstellung von RNA-Arzneimitteln sind effiziente und wirtschaftliche Methoden zur Herstellung einheitlicher RNA-Moleküle besonders wichtig – um so mehr, wenn die RNA-Wirkstoffe in großen Mengen produziert werden sollen. Derzeit werden RNAs mittels *in vitro*-Transkription oder chemische Synthese gewonnen. Allerdings sind diese Verfahren, die den Einsatz teurer Enzyme, synthetischer DNA-Matrizen und Chemikalien erfordern, kostspielig und mühsam. Die *in vivo*-Herstellung künstlicher RNAs mit

Hilfe von Mikroorganismen erscheint hier eine vielversprechende Methode. Sowohl die *in vivo*-Expression als auch die Aufreinigung künstlicher RNAs wurden bereits beschrieben<sup>2,3</sup>. Ponchon und Dardel berichten über die *in vivo*-Produktion rekombinanter RNAs mittels *Escherichia coli*<sup>2</sup> und schlagen ein als „t-RNA-Scaffold“ bezeichnetes System vor. Dabei tragen die RNA-Produkte an beiden Termini eine t-RNA-Sequenz, die sie vor dem Abbau durch endogene Ribonukleasen schützt. Umekage und Kikuchi entwickelten ein Verfahren zur *in vivo*-Produktion zirkulärer RNAs mit *E. coli*<sup>3</sup>. Die ringförmigen Produkte bleiben dabei stabil in den Zellen erhalten, weil sie resistent gegenüber zellulären Exonucleasen sind. Der Einsatz von *E. coli* als Produktionswirt bringt

mit sich, dass die an sich sehr erfolgreichen Methoden RNA-Scaffold und Zirkularisierung jedes Mal etabliert werden müssen, um den Abbau des Produktes durch zelluläre Nukleasen auszuschließen. Vor kurzem haben Kikuchi und Kollegen einen neuen Wirtsorganismus für die RNA-Produktion vorgeschlagen – das marine Bakterium *Rhodovulum sulfidophilum*, das Nukleinsäuren im Kulturmedium produziert, aber fast keine Ribonukleasen aufweist<sup>4</sup>.

## RNA-Aptamere aus Bakterien

*R. sulfidophilum* ist ein marines phototrophes Purpurbakterium aus der Gruppe der alpha-Proteobakterien<sup>5</sup>. Dieses Bakterium scheidet Nukleinsäuren in löslicher Form in das Kulturmedium aus. Unter Nährstoff-limitierenden Bedingungen bildet *Rhodovulum* strukturierte Zellgemeinschaften, die als „Flocken“ („flocs“) bezeichnet werden (Abb. 1)<sup>6</sup>. Die extrazelluläre DNA fungiert als eine Art „Klebstoff“ in der Flocke, der die einzelnen Zellen miteinander verbindet. Es wurde beschrieben, dass die in Vollmedium gebildete lösliche extrazelluläre DNA bei Nährstofflimitierung in die Flocke aufgenommen wird<sup>6</sup>. Mit der DNA scheint auch RNA von den Zellen freigesetzt zu werden. Auch die Charakterisierung der extrazellulären RNA von *R. sulfidophilum* wurde bereits beschrieben<sup>7</sup>. Es handelt sich meist um nicht-aminoacylierte, reife Vollängen-t-RNAs sowie Fragmente der ribosomalen 16S- und 23S-rRNA<sup>7,8</sup>. Das Bakterium stellt keinerlei im Kulturmedium detektierbare Ribonukleasen her, was möglicherweise der Funktion der extrazellulären RNAs zuzuschreiben ist<sup>4,8</sup>. Wohl auch deshalb ist bei den meisten der ins Kulturmedium ausgeschiedenen t-RNAs die reife nicht-acytylierte 3'-terminale CCA-Sequenz erhalten, obgleich diese sehr empfindlich gegenüber den weitverbreiteten Exonucleasen ist. Das Bakterium scheint daher sehr geeignet für die extrazelluläre Herstellung künstlicher RNA, sofern diese grundsätzlich möglich ist. Genau für diesen Zweck setzten Kikuchi und Kollegen den Stamm *R. sulfidophilum* DSM 1374T ein, denn gentechnische Methoden sind für diesen bereits gut etabliert<sup>9</sup>. Ein Konzeptschema der vorgeschlagenen Herstellung funktioneller künstlicher RNA ist in Abbildung 2 gezeigt.

Sie entwickelten ein Verfahren zur extrazellulären Herstellung eines RNA-Aptamers<sup>4</sup>. Als RNA-Wirkstoff-Produktmodell wurde ein Streptavidin-RNA-Aptamer<sup>10</sup> ausgewählt. Diese künstliche RNA verfügt über die Fähigkeit, spezifisch an Streptavidin zu binden. Sie konstruierten ein Plasmid, um ein Streptavidin-RNA-Aptamer mittels *R. sulfidophilum* direkt im Kulturmedium herzustellen. Die Aptamersequenz ist auf beiden Seiten von sich selbstschneidenden Hammerhead-Ribozym-Sequenzen flankiert – Sequenzen die ursprünglich aus Pflanzen-Virusoiden stammen. Das Selbstschneiden ist bei diesen ein unverzichtbarer Schritt der Virusoid-Reifung und tritt an einer spezifischen



# Bewertung der SOLiD-Sequenzierungsplattform aus Nutzerperspektive

Andreas Dahl, Florian Mertes, Uta Marchfelder, Stefan Börno, Axel Fischer, Michal Schweiger und Hans Lehrach; Abt. Analyse des Vertebratengenoms, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin

Das SOLiD-System von Life Technologies/Applied Biosystems (ABI) kam etwa ein Jahr nach den Next-Generation-Sequenzierern (NGS) der Hauptmitbewerber Roche und Illumina auf den Markt. Trotzdem kann es durch signifikante Entwicklungen in Technologie und Arbeitsablauf insbesondere im letzten Jahr momentan als das hinsichtlich Durchsatz stärkste System am Markt betrachtet werden. Im Folgenden soll das System aus Nutzerperspektive mit seinen Stärken und Schwächen beurteilt sowie kritische Punkte beim Arbeitsablauf beleuchtet werden.

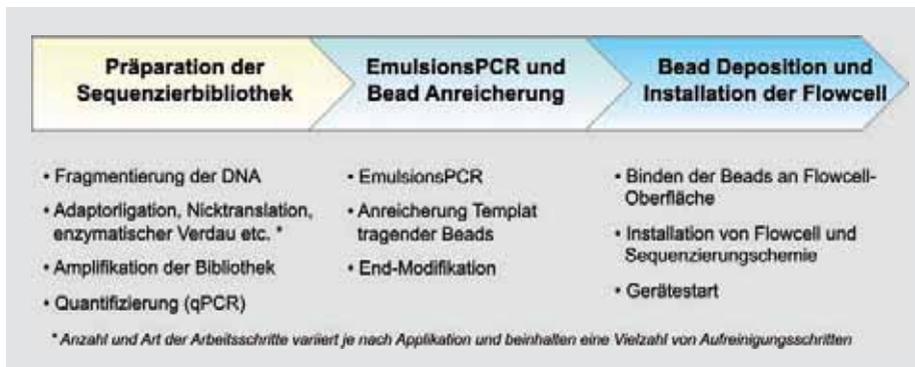


Abb 1: Überblick über den Arbeitsablauf bei der SOLiD-Sequenzierung

Vor dem eigentlichen Sequenzierlauf auf dem SOLiD3+ sind Vorarbeiten erforderlich (vgl. Abb. 1), die hier gemeinsam mit erfolgskritischen Arbeitsschritten beleuchtet werden sollen.

Die *Präparation der Sequenzierbibliothek* umfasst die Fragmentierung der DNA, Ligation universeller Adaptoren sowie applikationsabhängig weitere enzymatische Schritte. Danach erfolgt eine PCR-basierte Anreicherung korrekter Fragmente und deren Quantifizierung. Der zweite Teil beinhaltet die *Emulsions-PCR* (ePCR). Durch Herstellung einer Wasser-in-Öl-Emulsion werden ca. 1 µm große PCR-Primer-tragende, magnetische Kügelchen (Beads) in kleinste wässrige Tropfen eingeschlossen. Die wässrige Phase besteht aus einem PCR-Mix, der als Ausgangsmaterial (Templat) die Sequenzierbibliothek in geringer Konzentration enthält. Nach Aufteilen in eine Vielzahl kleinster Tröpfchen sind im Idealfall einzelne Templat-Moleküle mit einzelnen Beads gemeinsam in ein solches Vesikel eingeschlossen. Dann erfolgt durch Einzelmolekül-PCR die Herstellung monoklonaler Beads, die eine Vielzahl identischer Fragmente tragen. Da die korrekt mit PCR-Produkt beladenen Beads ca. 10% bis 20% der eingesetzten Beads entsprechen, werden sie isoliert (angereichert) und die gebundenen PCR-Produkte terminal modifiziert,

um eine Bindung an die sogenannte Fließzelle (Flowcell, FC) zu ermöglichen. Im dritten Teil des Arbeitsablaufes erfolgt die *Ablage (Deposition) der Beads* durch kovalente Bindung auf einem Objektträger. Dieser wird dann im Gerät zur Fließzelle zusammengesetzt und präsentiert bis zu 600 Mio. Beads zur parallelen Sequenzierung mittels wiederholter sequentieller Ligation von fluoreszierenden Sonden.

## Präparation der Sequenzierbibliotheken

Die minimal benötigte DNA-Menge für die Präparation der Sequenzierbibliotheken wird maßgeblich durch die DNA-Fragmentierung bestimmt. Bei kurzen Fragmenten für Standardbibliotheken genügen weniger als 1 µg (>50 ng) DNA. Für diesen Arbeitsschritt verwenden wir das mitgelieferte DNA-Scher-Instrument Covaris S2. In wenigen Minuten wird die gewünschte Fragmentlänge mit geringen Abweichungen erreicht. Bei den längeren Fragmenten für zum Beispiel Mate-Paired-Bibliotheken werden zur Fragmentierung mittels HydroShear erhebliche Mengen an DNA (mindestens 10 µg) benötigt.

Applikationsspezifische Standardprotokolle stehen für Fragment- und Mate-Paired-Sequen-

zierbibliotheken zur Verfügung. Dabei gibt es auf die einzelnen Anwendungen abgestimmte Adaptoren, welche direkt bei ABI oder anderen Herstellern bestellt werden können. Zur Präparation können Materialien von ABI, aber auch Komponenten anderer Hersteller genutzt werden. Die Präparation einer Fragmentbibliothek besteht aus fünf Schritten und dauert etwa einen Tag. Die Herstellung einer Mate-Paired-Bibliothek dagegen dauert vier Tage und ist relativ komplex. Hier greifen wir auf das von ABI empfohlene Material und Protokoll zurück. Im Detail: Der erste kritische Schritt besteht in der möglichst effizienten Zirkularisierung der Fragmente. Kritisch ist auch die darauf folgende Nick-Translation, welche die Fragmentlänge der finalen Bibliothek bestimmt. Dabei sind zwei Punkte zu beachten: Einerseits muss das Fragment lang genug sein, um die Sequenzierung von 2x50 bp zu ermöglichen, andererseits darf das nick-translatierte Fragment nicht zu lang werden, da sonst in der folgenden ePCR eine nur schlechte Effizienz erzielt wird. Aufgrund zahlreicher Aufreinigungsschritte und dem damit verbundenen erheblichen Verlust an DNA bei der Präparation einer Mate-Paired-Bibliothek sollten 10 µg bis 20 µg qualitativ hochwertige DNA zur Verfügung stehen.

Bei RNA-Präparationen (miRNA, Whole Transcriptome) werden Adaptoren mit kohäsiven Enden verwendet, wodurch eine gerichtete Ligation der Adaptoren erfolgt und so – theoretisch – 100% des Materials nutzbar wird. Zudem bleibt die für die Transkriptomanalyse wertvolle Stranginformation bei der Sequenzierung erhalten. Der Small RNA Expression (SREK)-Kit gestattet die Präparation kleinster Mengen einzelsträngiger RNA und kann auch für miRNA genutzt werden, wobei RNAs <40 nt vorher angereichert werden. Die saubere Größenselektion auf 105-150 bp nach der Adapter-Ligation beeinflusst erfahrungsgemäß unmittelbar den späteren Sequenzierungserfolg. Im Kit sind zehn Barcode-Adaptoren für Multiplexing enthalten, so dass bei Einsatz der achtfach unterteilten Fließzelle bis zu 80 Proben parallel sequenziert werden können. Die Auswertung und Zuordnung der Barcodes zu den Bibliotheken erfolgt – im Gegensatz zu normalen Multiplex-Bibliotheken – jedoch nicht direkt im Gerät, sondern später bioinformatisch. Dies verkürzt den Sequenzierlauf um einen Tag und erspart den Einsatz der teureren Barcode-Sequenzierungschemie. Von der RNA bis zur fertigen Bibliothek inklusive Qualitätskontrolle und Quantifizierungsschritten müssen etwa zwei bis drei Tage eingeplant werden.

Die Protokolle/Kits für Fragmentbibliotheken bedürfen wenig Einarbeitungszeit und haben sich als robust erwiesen. Kritisch ist der Amplifikations- und Anreicherungsschritt am Ende des Arbeitsablaufes, da es hier leicht zur Überamplifikation kommen kann. Dieses Problem ist zwar in den Protokollen adressiert, dennoch ist eine ausreichende Menge an Probenmaterial essentiell.

Generell gilt die Regel: je weniger Amplifikationsschritte (fünf bis acht) desto besser.

### Emulsions-PCR

Die kürzlich erreichte Zunahme des Durchsatzes bei SOLiD ist vor allem auf die Steigerung der Anzahl von Reads (Beads) pro Fließzelle zurückzuführen. In der ePCR werden monoklonale Beads erzeugt, welche mit 30.000 bis 100.000 Kopien eines Startmoleküls „beladen“ sind. Die Länge und Qualität der Bibliothek sowie die präzise Titration des in der ePCR eingesetzten Ausgangsmaterials haben sich als die kritischsten Parameter für die Produktion qualitativ hochwertiger Beads ergeben. Die Länge der Fragmente ist aufgrund der Größe der wässrigen Tröpfchen (Reaktoren) in der Emulsion auf maximal 300 bis 350 bp begrenzt. Die ePCR hat sich zu Beginn als relativ schwer kontrollierbar gezeigt. Sowohl verwendete Platten, Sealings als auch Cycler scheinen einen Einfluss zu haben und müssen von Labor zu Labor individuell etabliert werden. Dabei muss die von SOLiD angegebene Ausstattung nicht die beste Lösung sein. Für die präzise Titration der eingesetzten Templatenmenge in der ePCR hat sich eine real-time PCR als beste Methode erwiesen. Hier zeigen SybrGreen- und TaqMan-PCR vergleichbare Ergebnisse. Der Vorteil der Titration mittels real-time PCR ist, dass nur

DNA-Fragmente gemessen werden, die auch in der ePCR gut amplifiziert werden. Zudem eröffnet sich eine weitere Qualitätskontrolle über die Bestimmung der Schmelzkurve oder das Auftragen der PCR auf ein Gel.

Das Ansetzen der ePCR ist relativ unkompliziert, jedoch stößt man beim Betrieb mehrerer Geräte bald an Kapazitätsgrenzen hinsichtlich der dazu benötigten Thermocycler, aber auch im Hinblick auf den Arbeitsaufwand. Hier ist der Einsatz von Barcoding, wodurch Bibliotheken-Pools in einer ePCR eingesetzt werden können, sehr hilfreich.

Die Anreicherung der mit PCR-Produkt beladenen Beads ist der arbeits- und zeitaufwendigste Schritt bei der Beadproduktion. Zusätzlich erfordert dieser Teil viel Erfahrung und umsichtiges Arbeiten der ausführenden Person. Die Anreicherung erfolgt mit „Capturing Beads“, welche nur bei frischer Herstellung eine optimale Ausbeute an angereicherten ePCR-Beads ermöglichen. Die Vielzahl der notwendigen Waschschritte machen das Prozessieren unterschiedlicher Proben logistisch anspruchsvoll und zeitaufwendig. Durch die Arbeit mit Beads ist der Arbeitsablauf in der jetzigen Form auch nur bedingt automatisierbar. Durch Barcoding kann der Arbeitsaufwand erheblich gesenkt werden. Die Verwendung von „Low-Bind“-Gefäßen zur Reduktion von Materialverlusten hat sich als sinnvoll erwiesen. Hierbei sollten nasschemisch beschichtete Gefäße vermieden werden, da dies



Abb 2: Der SOLiD3+

die terminale Modifikation verhindern kann. Die End-Modifikation hat sich als unproblematisch gezeigt. Beads können über mehrere Wochen aufbewahrt werden.

### Bead Deposition/Fließzell-Installation

Durch terminale Modifikation der Bead-gebundenen PCR-Fragmente ist die kovalente Bindung der Beads an die FC-Oberfläche möglich. Bei SOLiD erfolgt dies nicht in der final assemblierten Fließzelle, sondern in einer sogenannten „Bead-Deposition-Kammer“. Die Dichte der deponier-



# Welcome to the world of Biotechnology



## Instrumentelle Analytik | Labortechnik Biotechnologie | analytica Conference

In Halle A3 dreht sich alles um das Thema Biotechnologie und um neueste Zukunftstrends wie Industrielle Biotechnologie oder Personalisierte Medizin.

### Auszug aus dem Themenprogramm:

- Kein Biolabor ohne Bioanalytik
- Rot – Grün – Blau: Biotechnologie gestern, heute und morgen
- Bioprozesstechnik in der Praxis
- Finanzierung von Life-Science-Unternehmen

Online  
registrieren +  
Vorteile sichern:  
[www.analytica.de/tickets](http://www.analytica.de/tickets)



**analytica 2010**

23.–26. MÄRZ | NEUE MESSE MÜNCHEN

[www.analytica.de/besucher](http://www.analytica.de/besucher)

Tab. 1: SOLiD 3+ auf einen Blick, FC= Flowcell

<b>Reads/Lauf</b>	bis 600 Mio.
<b>Leselänge [Basen]</b>	maximal 50 bp Fragment und Mate-Paired
<b>Sequenzinformation</b>	bis 30 Gigabasen / FC, 640 GB / Gerät
<b>Laufzeit</b>	bis zu 10 Tage
<b>Durchsatz/Tag</b>	5-6 GB, applikationsabhängig
<b>Durchsatz Fragmentlauf 50 bp</b>	bis zu 15 GB mappable / FC
<b>Durchsatz Mate-paired-Lauf 2x50 bp</b>	bis zu 25 GB mappable / FC
<b>Amplifikation</b>	Emulsions-PCR (ePCR)
<b>Träger</b>	Objekträger
<b>Kompartimente je FC</b>	1, 4, 8 - durch Kompartimentierung reduziert sich verfügbare FC-Fläche
<b>- 1</b>	450-600 Mio. Reads
<b>- 4</b>	70-100 Mio. Reads
<b>- 8</b>	25-40 Mio. Reads
<b>Preis pro Lauf</b>	
<b>erforderliche Hardware</b>	Covaris S2 (im Paketpreis enthalten) / HydroShear, Ultra Turrax Emulsifier (IKA)
<b>Präparation der Bibliotheken</b>	
<b>- Fragment-Bibliothek</b>	einfach, 5 Schritte an einem Tag, DNA Einsatz < 1µg
<b>- Mate-Paired-Bibliothek</b>	komplex, 15 Schritte an bis zu vier Tagen, hoher DNA-Einsatz (10-20 µg)
<b>- Paired-End-Sequencing</b>	mit Version 3+ nicht möglich, erst ab SOLiD 4
<b>- miRNA, cDNA</b>	einfach, in 1 bis 2 Tagen
<b>Arbeitsablauf</b>	<b>Stärken:</b> standardisierbar, etablierte applikationsspezifische Protokolle, Beads ermöglichen reproduzierbar hohe Beladung der Flowcell (FC) <b>Schwächen:</b> komplex durch nötige Kombination mit ePCR, großer Platzbedarf (Gerät, Pre/Post-PCR); teilweise zeitaufwendig; Beadproduktion zeitlich aufwendig, Automation bisher gering – erst ab Version 4 automatisierte Lösung für Bead-Produktion
<b>Barcoding</b>	<b>Stärken:</b> aktuell Barcoding mit 16 Barcodes (bis zu 128 Proben pro FC), <b>Schwächen:</b> bei Mate-Paired kein Barcoding möglich
<b>Durchsatz</b>	<b>Positiv:</b> hoch, 15 bis 25 GB/FC, hohe Anzahl kurzer Reads, Barcoding + Durchsatz führen zu signifikanter Kostenreduktion pro Probe <b>Negativ:</b> System stellt nur maximal 50bp Reads zur Verfügung
<b>Anwendungsbezogene Vorteile</b>	<b>hoher Durchsatz:</b> vorteilhaft für Resequenzierung (Mutationsanalyse), Chip-Seq & MeDIP, Transkriptomanalyse/-quantifizierung <b>kurzer Arbeitsablauf:</b> miRNA, short RNAs, Fragment
<b>Anwendungsbezogene Limitationen</b>	<b>kurze Leselänge:</b> Detektion kleiner Indels schwierig <b>kein Paired-End Sequencing</b>
<b>Verbrauchsmittel</b>	<b>Positiv:</b> Oligosequenzen frei verfügbar, <b>Negativ:</b> keine Flexibilität bei der Sequenzierungschemie
<b>Operationen am Gerät</b>	
<b>- Installation der Fließzelle</b>	erfordert Übung, dann aber unproblematisch
<b>- Installation der Chemie</b>	einfach, einmal zu Beginn des Laufes und bei Barcode oder Mate-Paired nach Abschluss des BC / ersten Fragmentes
<b>- Lauf-Überwachung</b>	über intuitive Software am Gerät oder über Webinterface
<b>Bioinformatik</b>	teilweise komplexer, da alle Analysen im „color space“ durchgeführt werden, Tools stehen für viele Applikationen zur Verfügung, bisher geringe Kompatibilität zu Programmen aus der Open Source Community
<b>Anschaffungskosten (von-bis)</b>	US\$ 600.000

ten Beads bestimmt den Durchsatz. Um die von ABI angegebenen 600 Mio. Beads pro Fließzelle zu erreichen (Version 3+), müssen Beads im Überschuss hinzugegeben werden. Eine Überladung wurde von uns nur bei extrem hohem Überschuss beobachtet (Faktor 1,5 bis 2x). Der von ABI zur Verfügung gestellte Konzentrationschart hat sich für die Quantifizierung als nicht sehr hilf-

reich erwiesen. Wir nutzen die photometrische Bestimmung bei 600 nm (NanoDrop).

Die Installation der Laufchemie am Gerät ist unkompliziert. Seit Version 3+ läuft das System pro Fragment ohne Austausch von Reagenzien (bis zu fünf Tage). Die Benutzersoftware ist intuitiv gestaltet. Lediglich die Schritte zum Laden der FC sind gewöhnungsbedürftig und

erfordern Übung, insbesondere die Fokussierung erfordert einiges an Geduld. Der Verlauf der Sequenzierung lässt sich komfortabel über die Instrument Control-Software und mittels eines per Intranet/Internet zur Verfügung gestellten „Webinterfaces“ verfolgen. Nach Abschluss des Laufes stellt das System verschiedene Berichte über die Qualität des Laufes zur Verfügung.

Zur Qualitätskontrolle des gesamten Arbeitsablaufes stehen sogenannte Workflow Analysis (WFA)-Läufe zur Verfügung. Dies wird von uns nur bei neuen und modifizierten Bibliothek-Präparationen oder zur Fehlerdiagnose verwendet, da für zwei FCs ein Tag Maschinenzeit verloren geht. In Anbetracht der Kosten pro Probe (25 bis 40 Euro) ist es jedoch ein günstiges und zugleich sinnvolles Werkzeug.

## Zusammenfassende Betrachtung

Im Vergleich zu anderen Sequenzertechnologien verfügt das SOLiD 3+-System über einen etwas komplexeren Arbeitsablauf und benötigt durch die Trennung von ePCR und Bibliothekenpräparation mehr Platz. Kritische Schritte im Arbeitsablauf sind in den zur Verfügung gestellten Protokollen adressiert. Nach Etablierung applikationsspezifischer Arbeitsabläufe ermöglicht das System einen erheblichen Durchsatz. Da die Gesamtkosten pro Fließzelle (gegenüber der Vorversion) nur wenig gestiegen sind, konnte der Preis pro GB Sequenz wesentlich reduziert werden. Durch die Kombination von Barcoding und der physikalischen Unterteilung der Fließzelle (in 1, 4 oder 8 Bereiche) können aktuell bis zu 128 Proben parallel sequenziert werden. Damit stellt die SOLiD-Plattform eine durchsatzstarke und zugleich flexible, auf eine Vielzahl von Applikationen anwendbare Plattform dar.

## Ausblick auf SOLiD 4

Mit SOLiD 4 erhöht sich gemäß ABI der Durchsatz der Plattform und der Preis pro GB wird weiter signifikant reduziert. Bis zu 500 Mio. „mappable reads“ pro Fließzelle oder 100 GB pro Lauf (2 FC) sollen zur Verfügung gestellt werden. Hervorzuheben gilt es, dass mit dieser Version endlich auch Paired-End Sequencing (1 x 50 bp und 1 x 25 bp) möglich sein wird. Zur Beadproduktion wird es eine automatisierte Lösung geben, die den manuellen Aufwand stark reduziert.

## Korrespondenzadresse

Andreas Dahl  
Max-Planck-Institute für molekulare Genetik  
Abteilung Lehrach  
Inhnestr. 73, 14195 Berlin  
Tel./Fax: +49-(0)30-8413-1517/ -1380  
dahl@molgen.mpg.de

# Die Rolle ZEB1-regulierter microRNAs in der Metastasenentstehung

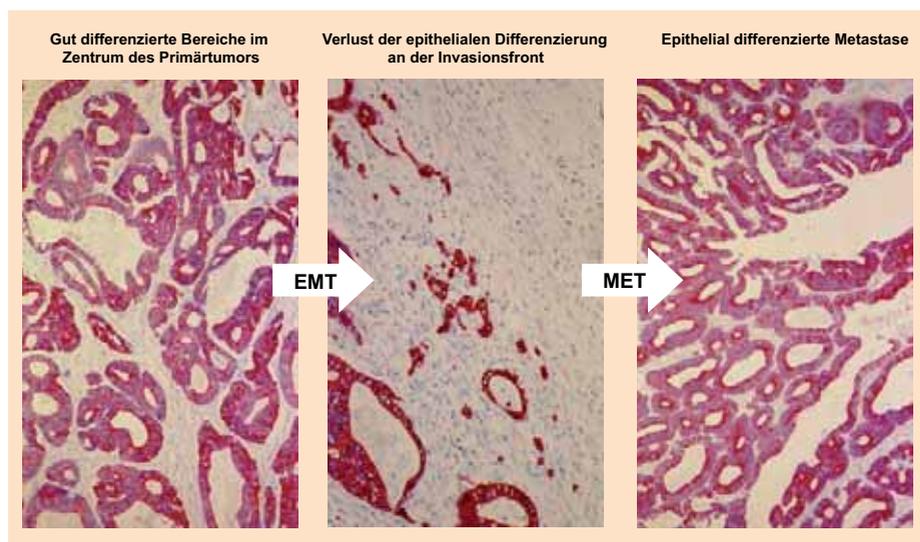
Dipl.-Biol. Jörg Schubert, Dr. Ulrich Wellner, Dipl. Mol. Med. Ulrike Burk, Dr. Otto Schmalhofer, Dr. Simone Brabletz, Prof. Dr. Thomas Brabletz, Molekulare Onkologie, Allgemein- und Viszeralchirurgie, Universitätsklinikum Freiburg

Das Gefährlichste an bösartigen Tumoren ist ihre Fähigkeit, sich im Körper auszubreiten und Metastasen zu bilden. Wir konnten zeigen, dass durch die Repression von microRNAs durch ZEB1 in Tumorzellen des Kolon und Pankreas ein embryonales Migrationsprogramm induziert wird – die sogenannte epithelial-mesenchymale Transition (EMT). Zusätzlich wird durch die Hemmung der Expression bestimmter microRNAs der Abbau von Stammzellfaktoren in denselben Zellen unterdrückt. Somit vereinen diese Tumorzellen Stammzeleigenschaften und die Fähigkeit, sich zu bewegen. Die daraus resultierenden beweglichen Tumorstammzellen sind vermutlich die Hauptquelle von Metastasen.

Mit mehr als 25.000 Todesfällen pro Jahr ist das kolorektale Karzinom die zweithäufigste krebisbedingte Todesursache in Deutschland. Auf dem vierten Platz der Todesstatistik durch Krebs folgen Tumore der Bauchspeicheldrüse (Pankreas). Beide Tumorarten haben gemein, im Anfangsstadium oft unentdeckt zu bleiben, da betroffene Patienten zu diesem Zeitpunkt selten über Schmerzen oder andere Symptome klagen. Oft wird der Tumor erst bemerkt, wenn er bereits Metastasen gebildet hat. Metastasierender Krebs ist die Haupttodesursache bei soliden Tumoren.

Eine bemerkenswerte Eigenschaft der Metastasen besteht darin, dass sie quasi ein Klon des Primärtumors sind. Eine oder einige wenige

Zellen des Ursprungtumors verändern ihre Eigenschaften so, dass sie sich von der Haupttumormasse ablösen und über das Blut- oder lymphatische System durch den Körper wandern können. Oft erst Jahre später, siedeln sie sich in anderen Organen an, proliferieren dort und bilden erneut einen Tumor mit ähnlichen Eigenschaften (z.B. mit ähnlichen Differenzierungsgrad) wie der Primärtumor (Abb. 1). Das bedeutet, die Prozesse, die es einer Tumorzelle ermöglichen zu metastasieren, müssen reversibel sein. Im Randbereich – der sogenannten Invasionsfront –, wo der Tumor invasiv in das umgebende Gewebe wächst, verlieren die Zellen ihre epitheliale Differenzierung und den Kontakt zu den Nachbarzellen – sie beginnen, sich vom



**Abb 1:** Transiente Dedifferenzierung und Redifferenzierung von Tumorzellen während der Metastasierung. Zu sehen ist ein gut differenziertes kolorektales Adenokarzinom, gefärbt gegen Cytokeratin 18. An der Invasionsfront geht die epitheliale Architektur verloren, und Zellen lösen sich vom Tumor. Die Metastase des Tumors zeigt wieder epitheliale Differenzierung<sup>11</sup>.

LABORWELT

**New!**

*It's your choice!*



*Next Generation Sequencing*



## SPRIworks

**Simplifies Next Generation Sequencing**

**Fully Automated**

**Fragment Library System**

**For the next Generation Sequencers**

- | Full Library Construction Process in a Cartridge
- | Easy to Use and Operate Bench-top System
- | No More Gels - Built in SPRI Size Selection Chemistry
- | Run up to 10 Samples at a Time
- | Maximizes Sequencing Work-flow



**Beckman Coulter GmbH**

47807 Krefeld Europark Fichtenhain B13

Tel. 02151/333 625

[www.beckmancoulter.de](http://www.beckmancoulter.de)

Tumor zu lösen (Abb. 1). Der Verlust der epithelialen Polarität kann durch extrazelluläre Signale wie das Zytokin TGF-beta ausgelöst werden und einen eher mesenchymalen Phänotyp induzieren. Man bezeichnet diesen Prozess – analog zu ähnlichen Vorgängen während der Embryonalentwicklung – als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und betrachtet ihn als den ersten Schritt auf dem Weg zur Metastasenbildung. Bislang konnten bereits einige Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die die EMT induzieren: zum Beispiel Twist, die Snail-Familie mit den Mitgliedern Snail1 und Snail2 sowie die Zink-Finger-Homöobox-Familie mit ZEB1 und ZEB2<sup>1</sup>.

Der Fokus unserer Arbeitsgruppe liegt auf der Erforschung der Rolle des EMT-Induktors ZEB1 in der epithelial-mesenchymalen Transition und Metastasenbildung. ZEB1 reprimiert eine Vielzahl von Genen, die für die epitheliale Differenzierung wichtig sind – zum Beispiel Zelladhäsionsmoleküle wie E-Cadherin oder Polaritätsfaktoren wie Lgl2 – und induziert die Expression mesenchymaler Faktoren wie Vimentin<sup>2</sup>.

Durch die stabile Herabregulierung der ZEB1-Proteinexpression mittels short-hairpin (sh)-RNA in dedifferenzierten kolorektalen und pankreatischen Tumorzelllinien mit mesenchyalem Phänotyp konnten wir eine epitheliale Redifferenzierung induzieren, also eine mesenchymal-epitheliale Transition (MET). Mit Hilfe dieser shZEB1-Zellklone konnten wir vergleichende Microarrayanalysen mit kontrolltransfizierten Zellen durchführen und diverse microRNAs (miR) identifizieren, deren Expression durch ZEB1 inhibiert wird.

### Die microRNA-200-Familie

MicroRNAs sind endogene, 17 bis 24 Nukleotide (nt) lange, nicht kodierende RNAs, die die Genexpression durch komplementäre Bindung an die mRNA spezifisch regulieren können. MiRNAs werden zunächst als lange primäre Transkripte

(Pri-miRNA) synthetisiert, die im Nukleus durch die Drosha-Endonuklease in haarnadelförmige, etwa 70 Nukleotide lange Prä-miRNAs prozessiert werden. Diese Vorläufer-microRNAs werden im Zytoplasma vom Dicer-Enzymkomplex weiter prozessiert, die resultierenden, etwa 22 nt langen doppelsträngigen RNA-Stücke aufgespalten und ein Einzelstrang in den RISC (RNA-induced silencing complex) integriert.

Dieser RISC-miRNA-Komplex reguliert die Expression von Zielgenen durch Bindung der miRNAs an komplementäre Bereiche in der 3'-nicht-translatierten Region (3'UTR) der mRNA. Die mRNA wird dadurch degradiert bzw. die Translation in Protein inhibiert<sup>3</sup>.

In Zellen mit epitheliale Phänotyp ist vor allem die miR-200 Familie stark exprimiert, in dedifferenzierten Zellen mit hohem ZEB1-Niveau dagegen reduziert. Die miR-200 Familie umfasst die fünf Mitglieder miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c und miR-429, die sich in zwei genomischen Loci auf Chromosom 1 (200a, 200b und 429) und Chromosom 12 (200c und 141) gruppieren. Mit Hilfe von Luziferase-Promotorkonstrukten, Chromatin-Immünopräzipitationen und EMSAs konnten wir zeigen, dass ZEB1 direkt die Expression des microRNA-Clusters auf Chromosom 12 reprimiert<sup>4</sup>. Bracken und Mitarbeiter konnten außerdem zeigen, dass dies auch für das andere Cluster der miR-200 Familie zutrifft<sup>5</sup>. Die fünf miR-200-Familienmitglieder besitzen sehr ähnliche sogenannte Seed-Sequenzen, über welche die microRNAs mit der Ziel-mRNA wechselwirken. Die Seed-Sequenz AAUACU der miRs 200b, 200c und 429 unterscheidet sich von AACACU der microRNAs 200a und 141 in nur einem Nukleotid. Daher ist es nicht überraschend, dass die Familienmitglieder überlappende Zielgene besitzen. Übereinstimmend mit drei anderen Arbeitsgruppen konnten wir zeigen, dass ZEB1 und ZEB2 Zielgene der miR-200 Familie sind<sup>4,6-8</sup>. Somit existiert ein negativer Rückkopplungsmechanismus, der entweder zur Stabilisierung der epithelialen Differenzierung im Zentrum von Karzinomen oder zur Aufrechterhaltung des

mesenchymalen Charakters der Tumorzellen an der Invasionsfront führen kann – je nachdem ob durch Signale von außen die Expression der miRNA-200-Familie oder von ZEB1 stärker induziert wird<sup>4,5</sup>.

Um den Einfluss von ZEB1 auf den Metastasierungsprozess *in vivo* zu untersuchen, führten wir orthotope Xenotransplantationsexperimente in athymischen Nacktmäusen mit den stabilen shZEB1-Pankreas- und Kolontumorzellklonen durch. Überraschenderweise wurde durch die verminderte ZEB1-Expression nicht nur die Metastasenbildung verlangsamt oder inhibiert, sondern auch das Tumorwachstum generell beeinflusst. So wuchs in 48% der Fälle überhaupt kein Tumor mehr und die Tumore, die noch wuchsen, waren deutlich kleiner. (Tabelle 1A). Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass ZEB1 für die Tumorinitiation wichtig ist und eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des Tumorstammzellphänotyps spielen könnte.

### Einfluss von microRNAs auf Tumorstammzell-Eigenschaften

Nach dem Konzept der Tumorstammzellen gibt es in einem Tumor – ähnlich wie man es aus Organen wie dem Darm kennt – einige Stammzellen, die den kompletten Tumor (bzw. den kompletten Darm) mit allen unterschiedlichen Zelltypen hervorbringen können.

Aktiviert nun eine Tumorstammzelle, beispielsweise durch TGF-beta-Signale aus dem Tumorumfeld, das seit der Embryonalentwicklung längst stillgelegte EMT-Programm, erlangt diese die Fähigkeit, sich aus dem Tumorverband zu lösen und zu migrieren. Nach dem von unserer Arbeitsgruppe postulierten Konzept der „*migrating cancer stem cells*“ sind diese mobilen Tumorstammzellen verantwortlich für die Metastasenbildung<sup>9</sup>.

**Tab. 1:** Tumorwachstum in Abhängigkeit von ZEB1. A. Orthotope Injektion von 10<sup>6</sup> Tumorzellen in Nacktmäuse. B. Subkutane Injektion von Tumorzellen in die Flanken von Nacktmäusen (Zahlen stehen für Mäuse mit Tumor)<sup>10</sup>

A.	Zelllinie	Tumorwachstum		Durchschnittliches Tumolvolumen (µl)		Metastasen	
		Kontrolle	shZEB1	Kontrolle	shZEB1	Kontrolle	shZEB1
Pankreas	MiaPaCa2	7/7	3/8	1064	145	+	–
	Panc1	6/6	4/6	650	180	+	–
Kolon	SW480	5/7	2/7	46	0,05	–	–
	HCT116	4/4	4/4	1360	380	++	(+)

B. Zelllinie	Klon	Zahl injizierter Zellen		
		10.000	50.000	250.000
Panc1	shZEB1	0	0	0
	Kontrolle	1	4	6
MiaPaCa2	shZEB1	0	0	0
	Kontrolle	1	4	4
HCT116	shZEB1	0	1	1
	Kontrolle	0	5	6

# best of biotech

get your business started!



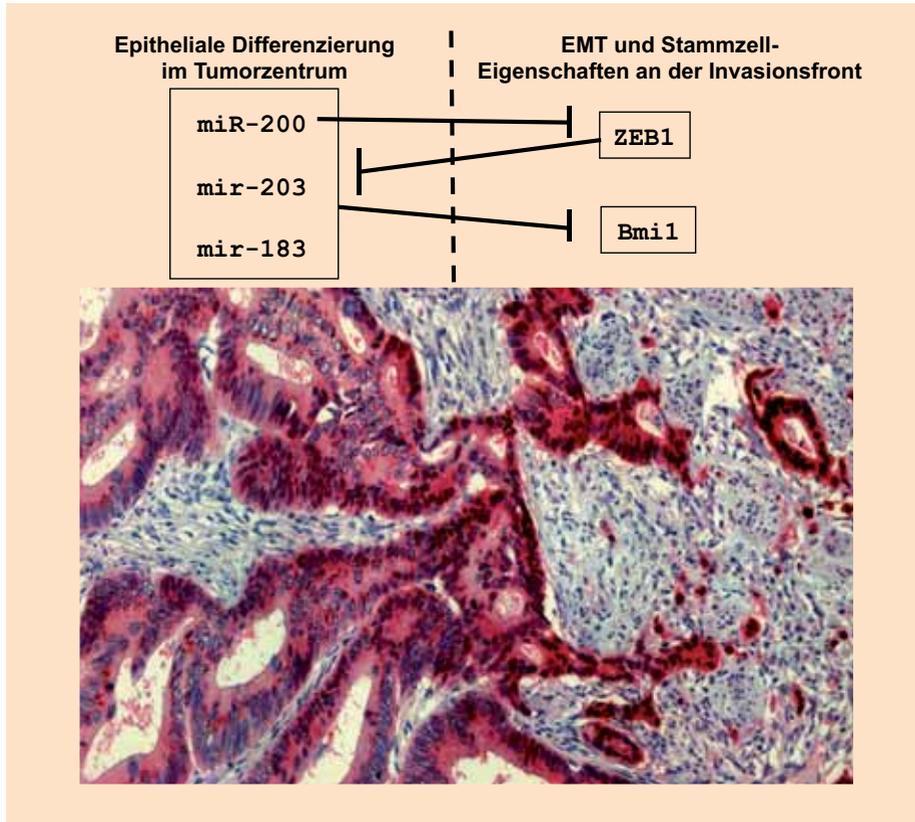
## // THE LIFE SCIENCE BUSINESS PLAN COMPETITION

[www.bestofbiotech.at](http://www.bestofbiotech.at)

REGISTER  
NOW  
ONLINE!

- Start: 01.02.2010
- Phase 1: 01.02.2010 - 29.04.2010  
Business Idea  
Prizes: 3 x 1,500 €
- Phase 2: 29.04.2010 - 21.10.2010  
Business Plan  
Prizes: 1<sup>st</sup> 15,000 €  
2<sup>nd</sup> 10,000 €  
3<sup>rd</sup> 5,000 €
- LISA VR Medtech Award: 10,000 €





**Abb 2:** Modell der Regulation der EMT und epithelialen Differenzierung. ZEB1 und die microRNA-200-Familie reprimieren sich gegenseitig. Dieser Rückkopplungsmechanismus stabilisiert entweder epitheliale Differenzierung im Tumorzentrum oder den EMT-Phänotyp an der Invasionsfront. Zusätzlich kontrolliert ZEB1 die Expression von miR-203 und miR-183, die – zusammen mit Mitgliedern der miRNA-200 Familie – die Expression von Stammzellfaktoren unterdrücken. Das Bild zeigt ein kolorektales Adenokarzinom gefärbt gegen beta-Catenin<sup>12</sup>.

Um den Einfluss von ZEB1 auf die tumor-initiierten Eigenschaften zu untersuchen, injizierten wir verschiedene Zellzahlen der shZEB1- und shKontroll-Klone je links und rechts subkutan in die Flanken von Nacktmäusen. Rund 10.000 Kontrollzellen, also Zellen mit hoher ZEB1-Expression, reichten aus, um ein Tumorwachstum zu induzieren. Dagegen wuchs bei den Zellen mit verminderter ZEB1-Expression selbst nach Injektion von 250.000 Zellen kein Tumor (Tab. 1B, S.13). ZEB1 scheint also notwendig, damit der Tumor wächst, ist aber nicht hinreichend.

Ein häufig verwendetes *in vitro*-Modell für die Anreicherung und Untersuchung von (Tumor-) Stammzellen ist die Kultivierung von Tumorzellen in Suspension als Sphäroide unter serumfreien Bedingungen mit definierten Wachstumsfaktoren. Unter diesen Kulturbedingungen können nur Stamm- oder Progenitorzellen proliferieren und ein Sphäroid bilden. Zellen mit wenig ZEB1 zeigten auch hier eine verringerte Anzahl potentieller Stammzellen im Vergleich zu Kontrollzellen.

Die Expression von Zelloberflächenproteinen, die charakteristisch für die pankreatische Tumorstammzellpopulation sind, war ebenfalls in den shZEB1-Zellen vermindert. Eine weitere Eigenschaft von Tumorstammzellen

ist ihre Resistenz gegen Chemotherapeutika. Deren Einsatz kann zwar einen Rückgang des Tumorwachstums bzw. des Tumors bewirken, aber nach einiger Zeit kommt es häufig zu einem Rezidiv, das aggressiver ist als der ursprüngliche Tumor. Unsere Zelllinien mit hoher ZEB1-Expression zeigten Resistenz gegen Gemcitabin (Gemzar), das in der Klinik beim Pankreaskarzinom am häufigsten verwendete Chemotherapeutikum. Nach dem Herunterregulieren der ZEB1-Expression durch shRNAs wurden die Zellen sensitiv für Gemzar<sup>10</sup>.

Auf der Suche nach einer molekularen Verbindung zwischen ZEB1 und der Stammzellbiologie entdeckten wir, dass Bmi1, ein Protein das wichtig für die Selbsterneuerung von Stammzellen aus verschiedensten Geweben ist, ein potentielles Target von mindestens drei verschiedenen, durch ZEB1 regulierten microRNAs ist: miR-200c, miR-203 und miR-183. Wir konnten zeigen, dass ZEB1 auch die Expression der miR-203 reguliert und in der Promotorregion von miR-183 Bindestellen für ZEB1 identifizieren.

Transfizierten wir diese microRNAs in die Tumorzellen mit hoher ZEB1-Expression, bildeten die Zellen weniger Sphäroide. Die miR-Überexpression führte also zu einer Verringerung der Stammzeleigenschaften,

und gleichzeitig nahm die Bmi1-Proteinmenge ab, bei unveränderter mRNA-Menge. Mit Hilfe von Luciferase-Reporterkonstrukten der Bmi1-3'UTR konnten wir zeigen, dass die microRNAs -200c, -203 und in geringerem Maße miR-183 die Bmi1-Reportergenaktivität verringern können und dies durch Mutation der miRNA-Bindestellen im 3'UTR verhindert werden kann. Die Überexpression der miRNAs in Zelllinien, die aus humanen Pankreastumoren etabliert wurden, hatte die gleichen Effekte auf die Bmi1-Expression und die Sphäroid-bildenden Eigenschaften<sup>10</sup>.

Wir konnten somit zeigen, dass die Expression von ZEB1 und die damit verbundene Repression der microRNAs miR-141, miR-200c und -203 den Tumorzellen Stammzeleigenschaften verleiht und darüber hinaus durch die Induktion von EMT die Mobilität dieser Stammzellen ermöglicht (Abb. 2). Der direkte Nachweis der Expression der beteiligten microRNAs *in vivo* an der Invasionsfront bzw. im Tumorzentrum steht allerdings noch aus.

Der von uns beschriebene Mechanismus erweitert das Verständnis der Metastasenentstehung. Die Inhibition von ZEB1 könnte ein vielversprechender Ansatz für die Entwicklung von Therapien für Tumorerkrankungen sein.

## Literatur

- [1] Peinado, H., Olmeda, D., Cano, A., Nat Rev Cancer 7 (2007), 415-28.
- [2] Spaderna, S., Schmalhofer, O., Wahlbuhl, M., Dimmler, A., Bauer, K., Sultan, A., Hlubek, F., Jung, A., Strand, D., Eger, A., Kirchner, T., Behrens, J., Brabletz, T., Cancer Res 68 (2008), 537-44.
- [3] Bartel, D.P., Cell 116 (2004), 281-97.
- [4] Burk, U., Schubert, J., Wellner, U., Schmalhofer, O., Vincan, E., Spaderna, S., Brabletz, T., EMBO Rep 9 (2008), 582-9.
- [5] Bracken, C.P., Gregory, P.A., Kolesnikoff, N., Bert, A.G., Wang, J., Shannon, M.F., Goodall, G.J., Cancer Res 68 (2008), 7846-54.
- [6] Gregory, P.A., Bert, A.G., Paterson, E.L., Barry, S.C., Tszykin, A., Farshid, G., Vadas, M.A., Khew-Goodall, Y., Goodall, G.J., Nat Cell Biol 10 (2008), 593-601.
- [7] Korpai, M., Lee, E.S., Hu, G., Kang, Y., J Biol Chem 283 (2008), 14910-4.
- [8] Park, S.M., Gaur, A.B., Lengyel, E., Peter, M.E., Genes Dev 22 (2008), 894-907.
- [9] Brabletz, T., Jung, A., Spaderna, S., Hlubek, F., Kirchner, T., Nat Rev Cancer 5 (2005), 744-9.
- [10] Wellner, U., Schubert, J., Burk, U.C., Schmalhofer, O., Zhu, F., Sonntag, A., Waldvogel, B., Vannier, C., Darling, D., zur Hausen, A., Brunton, V.G., Morton, J., Sansom, O., Schuler, J., Stemmler, M.P., Herzberger, C., Hopt, U., Keck, T., Brabletz, S., Brabletz, T., Nat Cell Biol 11 (2009), 1487-95.
- [11] Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L.A., Knuechel, R., Kirchner, T., Proc Natl Acad Sci U S A 98 (2001), 10356-61.
- [12] Brabletz, T., Verh Dtsch Ges Pathol 85 (2001), 243-9.

## Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Thomas Brabletz  
Molekulare Onkologie  
Allgemein- und Viszeralchirurgie  
Universitätsklinikum Freiburg  
Hugstetter Str. 55, 79106 Freiburg i. Br.  
Tel.: +49-(0)761-270-2577  
Fax: +49-(0)761-270-2579  
thomas.brabletz@uniklinik-freiburg.de

# Kalibrierte Diversitätsbestimmung von Nukleinsäurebanken

Tatjana Schütze<sup>1,2</sup>, Prof. Dr. Volker A. Erdmann<sup>1</sup>, Dr. Jörn Glöckler<sup>2</sup>,

<sup>1</sup> Institut für Biochemie, Freie Universität Berlin,

<sup>2</sup> Abteilung für Vertebratengenomik, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin

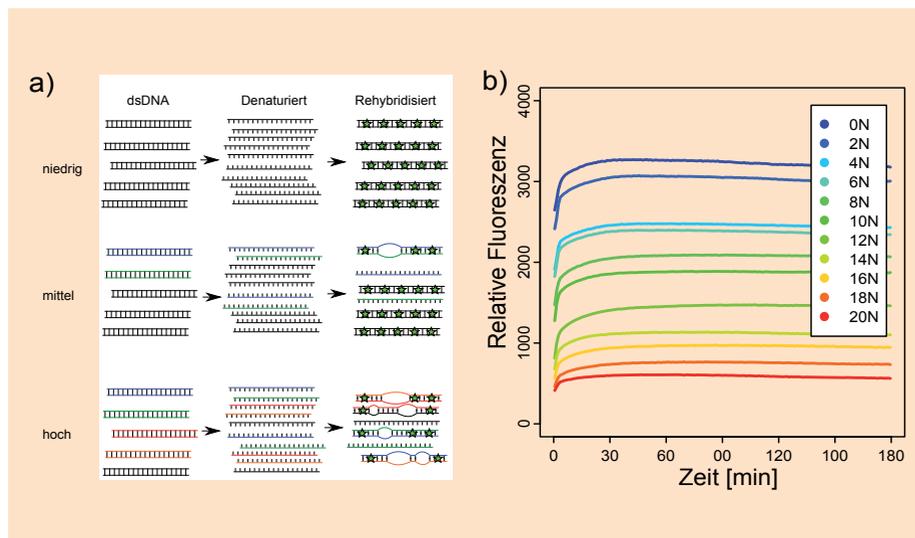
Nukleinsäuregemische mit Komplexitäten von bis zu  $10^{12}$  Sequenzen kommen bereits heute bei einigen modernen molekularbiologischen Technologien zum Einsatz. Die Bestimmung derart hoher Diversitäten kann durch den Vergleich mit synthetischen randomisierten Oligonukleotiden als internem Standard (DiStRO) erfolgen. Die Rückschmelzkurve nach Rehybridisierung gilt hierbei als bester Indikator für die Komplexität, da sich die Kinetiken hoher Diversitäten deutlich von denen niedriger unterscheiden. Ein direkter Vergleich von Nukleinsäurepools aus Aptamer-Selektionen zeigt, dass komplexe Populationen ohne aufwendige Berechnungen mit Hilfe von DiStRO bewertet werden können.

Für das Verständnis der allgemeinen Struktur von Genomen haben neben der photometrischen Bestimmung der Größe schon früh Schmelzpunktanalysen mit anschließender Rehybridisierung nach Britten & Kohne<sup>1</sup> eine grundlegende Rolle gespielt. Sie lieferten, bevor umfangreiche Sequenzierungen möglich wurden, wesentliche Informationen über die Komplexität eines Genoms, also die Anzahl unterschiedlicher Sequenzen.

Die Geschwindigkeit, mit der ein Einzelstrang eine komplementäre Sequenz findet und mit ihr hybridisiert, wird als Reassoziationskinetik bezeichnet. Die Geschwindigkeit dieser Reassoziationskinetik ist bei Einzelstrangkopien niedrig, bei repetitiven Sequenzen

dagegen hoch. Sie ist proportional zu den Parametern, die den  $C_0t$ -Wert bestimmen: der Ausgangskonzentration ( $C_0$ ) einer DNA-Sequenz und Reaktionszeit ( $t$ ). Der  $C_0t_{1/2}$ -Wert jeder DNA ist bei gleicher Moleküllänge und Renaturierungstemperatur linear proportional zur kinetischen Komplexität; damit geht aus einem doppelt so hohen Wert eine doppelt so hohe Sequenzheterogenität hervor.

Ursprünglich wurden Anwendungen von Reassoziations-Assays zur Charakterisierung von Genomen genutzt. Später konnten auch die Komplexität von cDNA- und synthetischen Nukleinsäurebanken damit bestimmt werden.



**Abb. 1:** Abhängigkeit der Fluoreszenz nach dem Denaturieren der Diversität. a. Prinzip des Verhältnisses von ausgebildetem Doppelstrang zu resultierender Fluoreszenz durch SYBR Green in Abhängigkeit verschiedener Diversitäten (niedrig, mittel und hoch). b. Messung der Rehybridisierung des Diversitätsstandards durch SYBR Green. 0N-20N entsprechen der Anzahl der jeweiligen randomisierten Basen.



## Evolution of business and research

### BIOTECHNICA 2010

Europas Nr. 1 für Biotechnologie und Life Sciences

Werden Sie jetzt Aussteller! 48% der Besucher informieren sich ausschließlich auf der BIOTECHNICA. Nutzen Sie diese Chance und treffen Sie auf innovative Unternehmen der Biotechnologie.

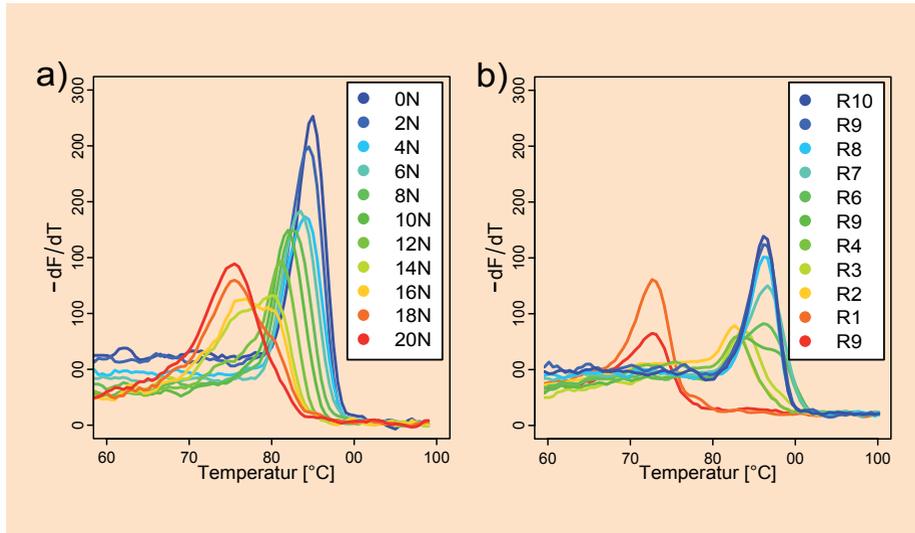
Das sind die Besucher der BIOTECHNICA:

- ▣ Einkäufer und Vertriebsverantwortliche
- ▣ Forscher, Entwickler und Wissenschaftler
- ▣ Anwender aus Laboren, Produktion und Qualitätskontrolle
- ▣ Geschäftsführer und Unternehmer
- ▣ Wirtschaftsförderer und Verbandsvertreter

**BIO  
TECHNICA**

Hannover, 5.–7. Oktober 2010

AUSSTELLUNG | KONFERENZEN  
PARTNERING | KARRIERE | AWARD



**Abb. 2:** Messungen der Fluoreszenzänderungen während des Rückschmelzvorgangs. a. Diversitätsstandard (0N-20N). b. Nukleinsäurepools der Daunomycinselektion aus den Runden 0 bis 10 (R0-R10)

Eine Adaption an moderne real-time-PCR-Geräte stellt die von Baum *et al.* publizierte AmpliC<sub>0</sub>t-Methode<sup>2</sup> dar. Der Anteil an doppelsträngiger DNA von zuvor amplifizierten Nukleinsäurepools wird hierbei mit Hilfe des Farbstoffes SYBR-Green gemessen. Das Fluoreszenzsignal sinkt durch erstmaliges Denaturieren der Probe und steigt während des Rehybridisierens bei geeigneter Temperatur wieder an. Die Kinetik dieser Rehybridisierung ist von der Diversität abhängig. Geringe Diversitäten bedingen eine schnelle Rehybridisierung. Dagegen bilden große Diversitäten nur langsam einen Doppelstrang aus. In der ursprünglichen Publikation zu AmpliC<sub>0</sub>t wurde eine Bestimmung von T-Zell-cDNA-Bank-Diversitäten bis zu 10<sup>6</sup> durch Extrapolation der erhaltenen Werte aus einer Mischung von 96 verschiedenen Klonen durchgeführt.

Da sowohl die ursprüngliche Methode als auch AmpliC<sub>0</sub>t aufwendige Berechnungen erfordern, liefern diese Verfahren keine schnellen und augenfällig vergleichbaren Ergebnisse. Betrachtet man dagegen die Rückschmelzkurven nach erneutem Denaturieren einer zuvor über einen ausreichend langen Zeitraum rehybridisierten Probe, lässt sich – abhängig von der Diversität – ein deutlicher Unterschied erkennen. Der sichtbare, relative Vergleich zwischen den Kurven bietet die Möglichkeit auf Kalkulationen zu verzichten, die zudem durch starke Extrapolation auch Fehler mit sich führen können.

Bei vielen molekularbiologischen Methoden, die auf *in vitro*-Evolution basieren, wie etwa SELEX<sup>3</sup> (engl.: Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment, dt: Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung), werden heutzutage

tage hochkomplexe Nukleinsäurebanken mit einer einheitlichen Länge eingesetzt. Um den Erfolg dieser zum Teil sehr kosten- und zeitaufwendigen Experimente besser abschätzen zu können, bietet sich ein Vergleich der Rückschmelzkurven mit jenen eines synthetischen Diversitätsstandard gleicher Länge an.

### DiStRO – Diversity Standard of Random Oligonucleotides<sup>4</sup>

Dieser Standard besteht – je nach Länge der zu vergleichenden Bank – aus einer definierten Anzahl zufälliger Nukleotide, die in einer konstanten Sequenz gleichmäßig verteilt sind. Darüber hinaus sind flankierende Primersequenzen zur gezielten Vielfältigkeit vorhanden. Aus jedem zufällig eingebauten Nukleotid (N) resultieren vier verschiedene Sequenzen und damit eine exponentiell ansteigende Diversität ( $D=4^N$ ), je nach Anzahl der variierten Basen. Das Spektrum von einem Klon bis hin zu 10<sup>12</sup> verschiedenen Sequenzen wird durch das Einfügen von 0N (keine variable Position) bis zu 20N ( $D=4^{20}$ ) erreicht.

Denaturieren der Nukleinsäuren und anschließendes Rehybridisieren über einen längeren Zeitraum sorgt – je nach Diversität und gewählter Rehybridisierungstemperatur – für die Ausbildung von Homo- und Heteroduplexen (siehe Abb. 1a). Das Fluoreszenzsignal der Rehybridisierung ist charakteristisch für jede Diversität (siehe Abb. 1b). Weiterhin sind die Unterschiede beim Rückschmelzen nach der erfolgten Rehybridisierung deutlicher als die Profile des vorangegangenen Rehybridisierens (Abb. 2a).

Konkret wurde die Diversitätsbestimmung auf die Selektion eines Aptamers gegen Daunomycin<sup>5</sup> angewendet (Abb. 2a und b). Dabei zeigte der Vergleich amplifizierter DNA

jeder Selektionsrunde mit dem Diversitätsstandard nicht nur ein deutliches Abnehmen der Diversität, sondern auch zu welchem Zeitpunkt die Selektion erfolgreich beendet war. Schon nach zwei Runden war die Population von ursprünglich 10<sup>15</sup> auf nur noch 10<sup>7</sup> Moleküle vermindert. Desweiteren konnte bei der ersten nachweisbaren Anreicherung von Bindern in der fünften Runde eine Diversität von 10<sup>6</sup> bis 4x10<sup>4</sup> verschiedener Sequenzen ermittelt werden. Die Diversität der letzten Selektionsrunde entsprach 2N (16), was mit den Ergebnissen aus Klonierung und Sequenzierung übereinstimmte.

### Fazit

Mit Hilfe des einfach zu synthetisierenden Diversitätsstandards lassen sich sehr schnell und einfach unbekannte DNA-Populationen von einem einzelnen Klon bis zu 10<sup>12</sup> verschiedenen Sequenzen normieren und charakterisieren. Rückschmelzkurven von *in vitro*-Selektionsrunden können durch Mitführen des internen Standards schnell und ohne aufwendige Berechnungen Aufschluss über den Erfolg eines Experimentes geben. Weitere neue und gegenwärtig noch kostenintensive Einsatzgebiete, wie etwa die Hochdurchsatz-Sequenzierungstechnologie, können ebenfalls von der kalibrierten Diversitätsanalyse profitieren, welche damit generell zu einer besseren Nutzung von Zeit und Ressourcen beitragen kann.

### Danksagung

Dr. Glökler und Frau Schütze werden durch den Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE) ko-finanziert [ProFIT Projekt-nummer 10139409]

### Literatur

- [1] Britten, R.J. & Kohne, D.E., Science 161 (1968), 529-540.
- [2] Baum, P.D. & McCune, J.M., Nat. Methods 3 (2006), 895-901.
- [3] Tuerk, C. & Gpld, L., Science 249 (1990), 505-510
- [4] Schütze, T., Arndt, P.F., Menger, M., Wochner, A., Vingron, M., Erdmann, V.A., Lehrach, H., Kaps, C., Glökler, J., Nucleic Acids Research (2009), 1-5
- [5] Wochner, A., Cech, B., Menger, M., Erdmann, V.A., Glökler, J., Biotechniques 43 (2007), 344, 346, 348

### Korrespondenzadresse

Dr. Jörn Glökler  
AG Nucleic Acid-based Technologies  
Abteilung Lehrach  
Max-Planck-Institut für molekulare Genetik  
Inhnestr. 63-73  
14195 Berlin  
Tel.: +49-(0)30-84131122  
gloekler@molgen.mpg.de

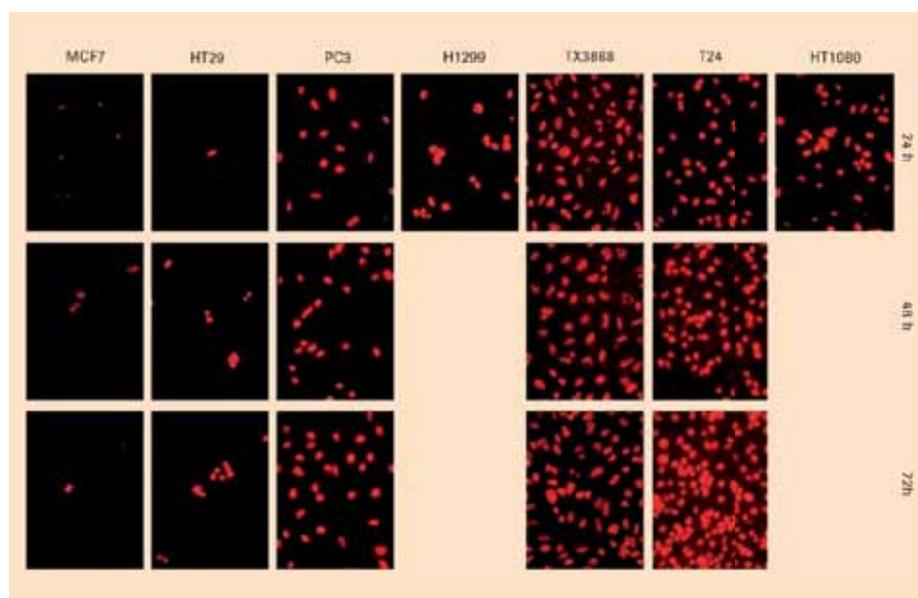
# Echtzeitmonitoring des Gene Silencings von Zellmigrationsregulatoren

Dr. Markus Greiner und Prof. Dr. Richard Zimmermann,  
Abt. für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes, Homburg

Arzneimittel, die die Zellmigration hemmen, haben sich in zahlreichen präklinischen und klinischen Studien als wirksam bei der Beschleunigung der Wundheilung und der Behandlung von Entzündungskrankheiten erwiesen<sup>1</sup>. Mit dem Psoriasis-Antikörper Efalizumab (Roche) und dem Multiple Sklerose-Wirkstoff Natalizumab stehen bereits seit einigen Jahren in Entzündungsindikationen zugelassene monoklonale Antikörpertherapien zur Verfügung. Seit kurzem werden erste Migrationsinhibitoren auch in verschiedenen Krebsindikationen klinisch geprüft<sup>1</sup>. Mittelfristiges Ziel ist es, die tödliche Metastasierung von Primärtumoren zu unterbinden. Der Prozess der gerichteten Zellmigration umfasst neben der Erkennung extrazellulärer Signale, zum Beispiel durch Chemokin-Rezeptoren, das abgestimmte Zusammenwirken zellulärer Prozesse, wie der Zellpolarität, von Integrinen und Selektinen sowie der intrazellulären Signalübertragung<sup>1,2</sup>. Bei Krebs sind neben der Fähigkeit der Krebszelle zur Proliferation, die Migration und das invasive Wachstum die wichtigsten krankheitsverursachenden Parameter. Wir haben untersucht, welchen Einfluss das zelluläre Protein X in diversen Krebszelllinien auf deren Fähigkeit zur Migration ausübt. Dazu wurde die Protein X-Expression mit siRNAs gehemmt und die Zellmigration mit dem xCELLigence RTCA DP Instrument mit CIM-Plate 16 (Abb. 1; Roche Applied Science, Penzberg) in Echtzeit verfolgt. Unsere Daten belegen, dass Protein X in allen untersuchten Tumorzelllinien am Migrationsvorgang beteiligt ist und damit einen Angriffspunkt für therapeutische Interventionen darstellt. Die Resultate bilden die Grundlage für weitere Untersuchungen, die auf ein besseres Verständnis der molekularen Prozesse abzielen, die der Zellmigration zugrunde liegen.

Zellmigrations-Inhibitoren beeinträchtigen nicht allein die Fähigkeit einer Zelle, sich in Richtung bestimmter Gewebe zu bewegen und sich an diese anzuheften. Sie beeinflussen durch ihre Wirkung auf Chemokin-Rezep-

toren auch Prozesse wie die Ausschüttung von Mediatoren, die Metastasierung oder die Angiogenese<sup>1</sup>. Wir haben ein neues Verfahren getestet, das – im Gegensatz zu den bisher gängigen Endpunktbestimmungen – die



**Abb 2:** Mikroskopische Analyse migrierter Zellen nach Anfärbung. Gezeigt sind Methanolfixierte und Propidiumiodid-gefärbte Zellen 24, 48 und 72 Stunden nach Aussaat in 24-Well-Platten im BD Falcon FluoroBlok-System. Ein FBS-Gradient (0,5%-10%) wurde als Attraktans eingesetzt.



**Abb 1:** xCELLigence RTCA DP Instrument mit CIM-Plate 16

dynamische Messung der Zellmigration unabhängig von Proliferationsereignissen gestattet.

## Zellkultur

T24-, HT29-, MCF7-, TX3868- und HT1080-Zellen wurden in DMEM-Medium (Gibco Biochrom) und 1% Penicillin/Streptomycin (PAA) enthielt. H1299-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium (PAA) mit den gleichen Zusätzen kultiviert. Alle Zellen wurden zur Kultivierung, während der siRNA-Behandlung und während der Migrationsassays in Feucht-Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Sättigung inkubiert.

## Posttranslationales Gene Silencing

Für das Gene Silencing wurden 1,2 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Well in 12-Well-Platten sowie 2,4 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Well in 6-Well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden mit siRNAs transfiziert, die spezifisch gegen Protein X-mRNA oder Kontroll-RNA (AllStars Negative Control siRNA, Qiagen) gerichtet waren. Dabei kam bei der Transfektion jeweils das HiPerFect Transfections-Reagens (Qiagen) gemäß Herstellerangaben zum Einsatz. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen ein zweites Mal transfiziert.

## Zellmigrations-Assay

Die Zellmigration wurde im BD Falcon FluoroBlok-System in 24-Well-Einsätzen getestet. Circa 2,5 x 10<sup>4</sup> PC3-Zellen, die mit Kontroll- oder Protein X-spezifischer siRNA behandelt worden waren, wurden in DMEM-Medium ausgesät, das 0,5% FBS enthielt. Die Einsätze wurden in DMEM-Medium mit 10% FBS als Attraktans plaziert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die Zellen mit Methanol fixiert, mit Propidiumiodid oder DAPI angefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Ergebnisse dieses Ansatzes wurden mit jenen verglichen, die die neue Technik der Echtzeit-Migrationsüberwachung auf dem

xCELLigence System RTCA DP Instrument mit CIM-Plate 16 (Roche Applied Science) liefert. In der CIM-Plate wurden  $1,0 \times 10^4$  bzw.  $2,0 \times 10^4$  Zellen, die entweder mit siRNA (spezifisch oder Kontrolle) oder nicht behandelt worden waren, in die obere Kammer einer CIM-Plate 16 in das beschriebene Medium jeweilige Zelllinienmedium ausgesät. Die obere Kammer wurde dann auf die untere Kammer der CIM-Plate 16 plaziert, welche Wachstumsmedium enthielt, das mit 10% FBS als Attraktans supplementiert oder FBS-frei (Negativkontrolle) war. Die Zellmigration wurde während eines Zeitraums von bis zu 18 Stunden überwacht.

### Ergebnisse

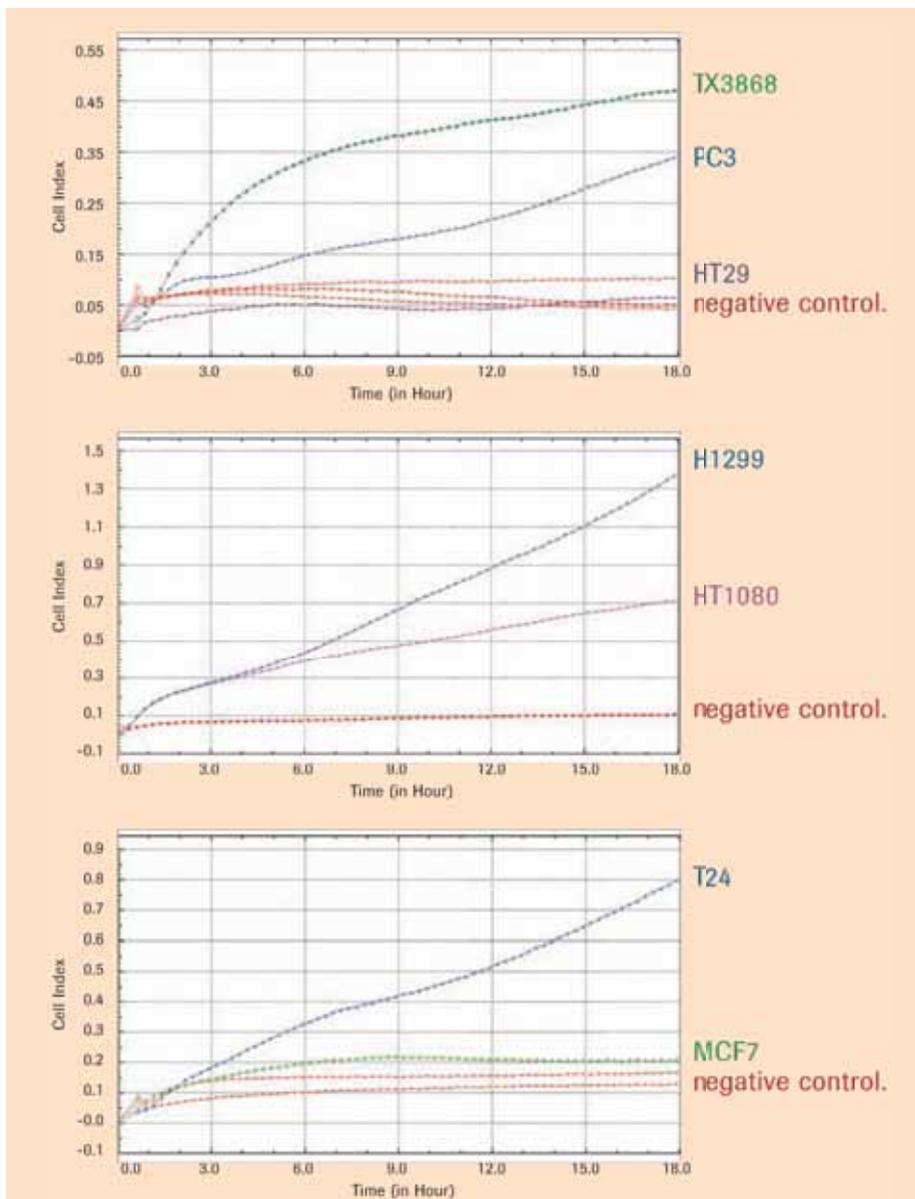
Im ersten Versuchsteil testeten wir das Migrationspotential diverser Tumorzelllinien in

einem Transwell-*in vitro*-Migrations-Assay. Die Migration wurde nach 24, 48 und 72 Stunden durch Zellfixierung mittels Methanol gestoppt und die Zellen mit Propidiumiodid angefärbt. HT1080- und H1299-Zellen wurden nach nur 24 Stunden analysiert, da sich dies in vorangegangenen Studien als optimaler Zeitpunkt für diese Zelllinien erwiesen hatte. Nach 24 Stunden zeigten HT1080-, T24- und TX3868-Zellen ein hohes Migrationspotential, wie sich durch die Präsenz zahlreicher angefärbter Zellen auf der Unterseite der Membran zeigte. Ihre Zahl war für T24- und TX3868-Zellen nach 48 oder 72 Stunden sogar noch höher (siehe Abb. 2, Spalte 5-7). Für PC3-Zellen ermittelten wir anhand der Zahl der angefärbten Zellen ein mittleres Migrationspotential nach 24 Stunden, das nach 48 und 72 Stunden anstieg (vgl. Abb. 2, Zelllinie 5). Bei den verbleibenden Zelllinien HT29 und MCF7 (Abb. 2, Spalte 1-2) wurde nur wenig

oder gar keine Migration beobachtet. Um die Ergebnisse zu bestätigen und weitergehende Informationen über die Migrationskinetik zu gewinnen, testen wir die gleichen Zelllinien mit dem RTCA DP Instrument mit CIM-Plate 16. Auch mit dem xCELLigence System zeigten TX3868-, HT1299- und T24-Zellen die schnellste Migration. In den ersten sechs Stunden beobachteten wir bei HT1080- und H1299-Zellen eine ähnliche Kinetik. In Übereinstimmung mit den Resultaten der Endpunktbestimmung zeigten PC3-Zellen eine intermediäre Migrationskinetik, während HT29- und MCF7-Zellen nicht migrierten und mit der Negativkontrolle vergleichbar waren (Abb. 3).

Verglichen mit der Endpunktbestimmung gestattete das Echtzeit-Monitoring der Zellmigration eine wesentlich schnellere Generierung von Resultaten. Statt nach 72 Stunden Zellkultur lagen vergleichbare Ergebnisse bereits nach 18 Stunden vor. Darüber hinaus lieferte die Echtzeitüberwachung der Zellmigration eine klarere, präzisere Analyse der Kinetik, die im Gegensatz zur strikten Endpunktmethode eine Unterscheidung zwischen Migration und später einsetzenden Proliferationseffekten erlaubte.

Um die Analysen weiter zu optimieren, wählten wir die T24-Zelllinie, die sowohl in Endpunktbestimmungen als auch bei Zellanalysen in Echtzeit ein hohes Migrationspotential gezeigt hatte. In diesem System testeten wir, ob das spezifisch Krebs-assoziierte Protein X für die Zellmigration erforderlich ist. Dazu reduzierten wir die Konzentration des Proteins in T24-Zellen, indem wir die Krebszellen mit siRNAs transfizierten, die spezifisch auf X-mRNA-Sequenzen abzielten. Erneut verglichen wir die Ergebnisse der Echtzeit-Migrations-Analyse mit denen der Endpunktmethode, bei der die Zahl der DAPI-gefärbten T24-Zellen nach Migration im BD Falcon FluoroBlok-System ermittelt wurde (vgl. Abb. 4A). Die Säulen in Abbildung 4b zeigen den Anstieg der mit der RTCA Software berechneten Migrationskurven für T24-, TX3868-, und HT1080-Zellen, die in CIM-Plates 16 analysiert wurden. Bei allen Zelllinien ging das siRNA-vermittelte Silencing von Protein X mit einer signifikanten Abnahme der Migration einher. Dabei war der Effekt in HT1080- und TX3868-Zellen ausgeprägter, T24-Zellen erschienen dagegen mehr durch das Transfektionsprotokoll selbst beeinträchtigt. Diese herabgesetzte Fähigkeit der T24-Zellen zur Migration nach Transfektion mit KontrollsiRNA konnte ausschließlich mit Hilfe des Echtzeit-Monitorings erfasst werden. Unsere Daten belegen, dass Protein X benötigt wird, damit Krebszellen migrieren können.



**Abb. 3:** Echtzeit-Monitoring der Zellmigration mit dem xCELLigence System in Verbindung mit der CIM-Plate 16. Circa  $1,0 \times 10^4$  Zellen wurden jeweils in eine CIM-Plate 16 ausgesät und das Migrationsverhalten jeder einzelnen Zelllinie für 18 Stunden überwacht.

### Fazit

Der Einsatz einer Echtzeiterfassung der Zellmigration bot – verglichen mit Endpunktbestimmungen – signifikante Vorteile. Erstens

# 5 JAHRE Liquidator<sup>96</sup>

Manuelle 96-Kanal Pipettierpower, die begeistert und das Pipettieren von Assays, ELISA, DNA/RNA-Isolationskits, PCR/Realtime-PCR, Proteinkristallisation, Screenings, Zellkulturarbeiten uvm. rasant beschleunigt und enorm vereinfacht.

Das muss gefeiert werden.

**JUBILÄUMSPREIS**  
statt

~~€ 12.600,-\*~~

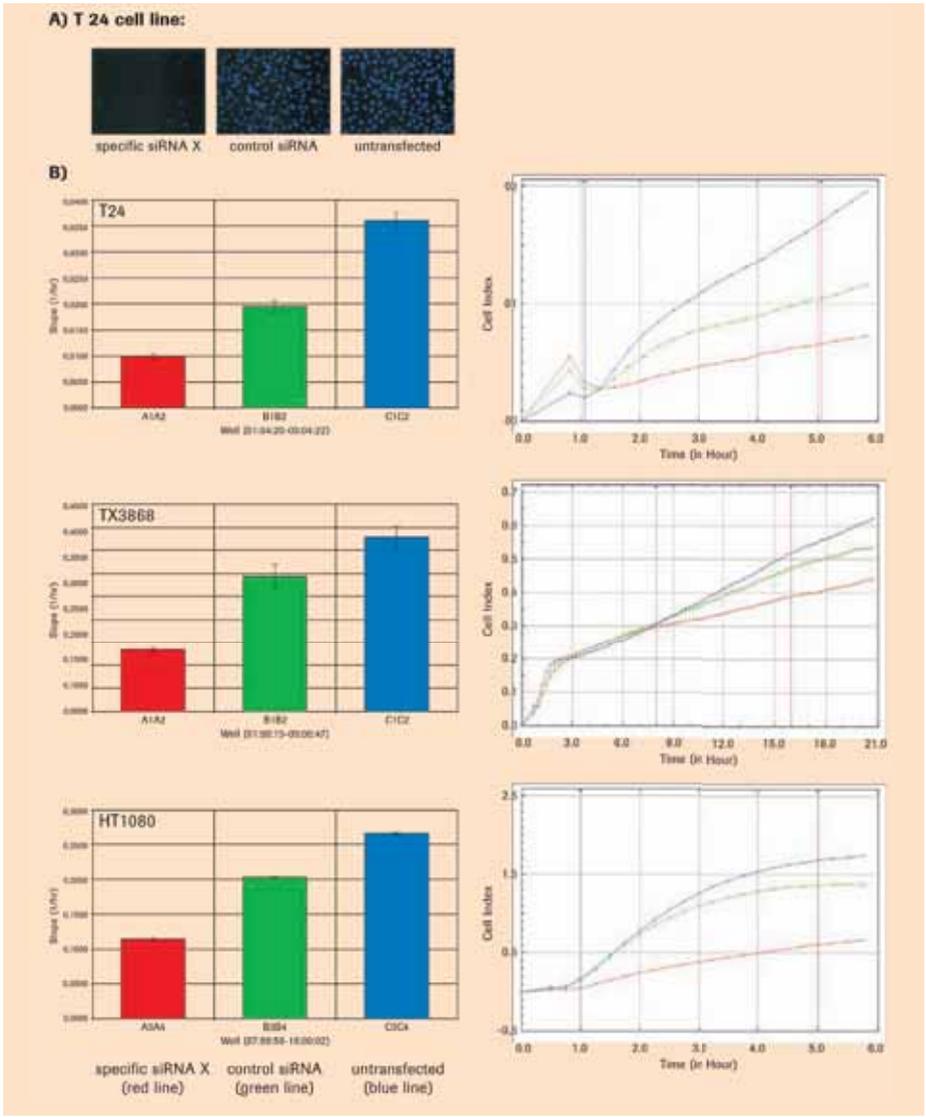
nur  
**€ 9.999,-\***

Angebot nur gültig bis 30.4.10



Unter [www.liquidator96.de](http://www.liquidator96.de) können Sie sich gleich selbst ein Bild machen von der überragenden Leistungsfähigkeit und verblüffenden Einfachheit dieses Gerätes.

\* Preis zzgl. MwSt.



**Abb. 4:** A. Zellmigration nach Gene Silencing. Zirka  $2,5 \times 10^4$  T24-Zellen (entweder nicht transfiziert, transfiziert mit Kontroll-siRNA oder aber spezifischer Protein X-siRNA) wurden in 24-Well-Einsätze des BD Falcon FluoroBlok-Systems (BD Biosystems) ausgesät. Ein FBS-Gradient von 0,5% bis 10% wurde als Attraktans eingesetzt. Die Fotos zeigen Methanolfixierte, DAPI-gefärbte Zellen nach 48 Stunden Migration. B. Zellen wurden nach dem gleichen Protokoll wie in A. transfiziert und anschließend  $1,0 \times 10^4$  Zellen in CIM-Plates 16 (Roche Applied Science) 72 Stunden nach der ersten Transfektion ausgesät. Unter Einsatz des xCELLigence RTCA DP Instrumentes (Roche Applied Science) wurde die Migration von T24-, TX3868-, and HT1080-Zellen online verfolgt und aufgezeichnet sowie der Anstieg der Migrationskurve mit Hilfe der RTCA 1.2 Software berechnet (linke Spalte).

war die Methode auf dem xCELLigence RTCA DP Instrument mit CIM-Plate 16 wesentlich schneller und mit weniger Arbeitsaufwand verbunden. Zweitens machte sie Experimente zu Identifizierung und Optimierung des idealen Messzeitpunktes überflüssig. Drittens stellt die Möglichkeit, Messungen der Migration und der Proliferation zu kombinieren, eine direkte Kontrolle dar, die sicherstellt, dass die herabgesetzte Migrationsfähigkeit nicht auf eine reduzierte Zellviabilität zurückzuführen ist.

### Literatur

- [1] Mackay CR. (2008). Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. *Nat. Immunol.*, 9: 988-998.
- [2] Weijer CJ. (2009). Collective cell migration in development. *J Cell Sci.*, 122: 3215-3223.

### Korrespondenzadresse

Dr. Burkhard Ziebolz  
Roche Applied Science GmbH  
Nonnenwald 2  
82377 Penzberg  
burkhard.ziebolz@roche.com



LABORWELT

**STEINBRENNER**  
LABORSYSTEME GMBH  
SERVICE FOR SCIENCE

Steinbrenner Laborsysteme GmbH  
In der Au 17, D-69257 Wiesenbach  
Tel.: +49 (0)6223 861247 Fax: +49 (0)6223 861248  
[www.steinbrenner-laborsysteme.de](http://www.steinbrenner-laborsysteme.de)  
[mail@steinbrenner-laborsysteme.de](mailto:mail@steinbrenner-laborsysteme.de)

# Automatisiertes Sortieren embryonaler Stadien von *C. elegans*

Marlon Stoeckius, Berlin Institute for Medical Systems Biology am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin

*Caenorhabditis elegans* ist einer der wichtigsten Modellorganismen für die Erforschung der Embryonalentwicklung. Diese konnte bisher nicht systematisch mit Hochdurchsatz-Methoden untersucht werden, da das Sammeln von großen Mengen Embryonen gleichen Alters unpraktikabel war. Dieser Bericht beschreibt eine Methode, eFACS, mit der *C. elegans*-Embryonen in ihren spezifischen Entwicklungsstadien in großen Mengen mit einem Zellsortierer sortiert werden können. eFACS ermöglicht damit erstmals Studien zur Embryonalentwicklung mit modernen Hochdurchsatzmethoden. Wir nutzten das Verfahren, um einzellige Embryonen in diesem Stadium zu sortieren und verglichen dann das Transkriptom kleiner nicht-kodierender RNAs mit dem von Eizellen und zwei- bis vierzelligen Embryonen. So haben wir erstmalig Einblicke in die Aktivitätsdynamik kleiner RNAs in einem Zeitfenster von etwa 30 Minuten der frühen Embryonalentwicklung gewonnen.

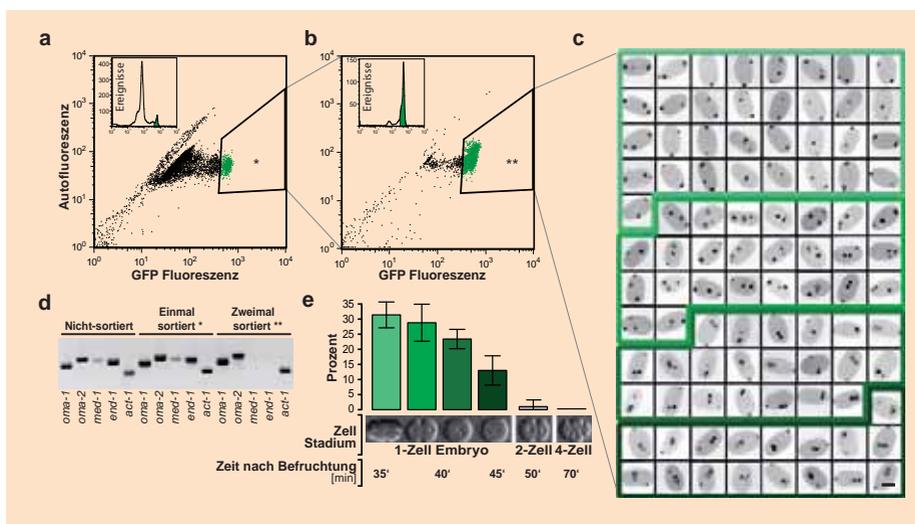
Kurze Zeit nach der Verschmelzung von Spermium und Eizelle werden diese hochspezialisierten Zellen in eine totipotente Zelle umgewandelt, die Zygote. Dieser fundamentale Prozess (Oozyten/Embryo-Transition) umfasst die Beendigung der zweiten Reifeteilung der Eizelle (Meiose II), eine Umstrukturierung des Proteoms, Transkriptoms und Genoms sowie die Initiierung der ersten Zellteilung. In der Eizelle und der frühen Zygote ist die RNA-Polymerase II (RNAPII) noch inaktiv. Je nach Spezies wird das embryonale Genom während des Zweizell- bis 16-Zell-Stadium aktiviert. Die Genprodukte

sind allerdings erst einige Minuten bis Stunden nach der Initiierung der Transkription funktionell<sup>2,4</sup>. Die Reprogrammierung von Eizelle und Spermium zum totipotenten Embryo wird daher von Genprodukten kontrolliert und koordiniert, die aus der Eizelle und/oder dem Spermium stammen. Dieser Prozess ist somit besonders für die Erforschung der posttranskriptionellen Genregulation interessant, die sowohl auf Ebene des Transkripts als auch auf Ebene des Proteins stattfinden kann. Der Knock-out oder Knock-down von Schlüsselproteinen des microRNA-Signalweges führt

bei Wirbellosen und Wirbeltieren zum frühen Absterben der Embryonen. Diese und weitere Forschungsergebnisse der letzten Jahre deuten darauf hin, dass miRNAs und andere kleine, nicht-kodierende RNAs eine Schlüsselrolle in der frühen Embryonalentwicklung spielen<sup>5,7</sup>. In der Eizelle und der Zygote sind jedoch die Populationen kleiner, nichtkodierender RNAs bisher unbekannt. Genomweite Studien des Transkriptoms und Proteoms in der Eizelle und der Zygote versprechen, die mögliche Funktion der miRNAs bei der Kontrolle der Oozyten/Embryo-Transition besser zu verstehen.

Der seit den achtziger Jahren untersuchte Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* ist neben der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und dem Frosch *Xenopus laevis* ein vielgenutzter Modellorganismus in der Entwicklungsbiologie. Der etwa ein Millimeter große Wurm lässt sich einfach im Labor kultivieren und hat eine kurze Generationszeit. In seiner Embryonalentwicklung sind das Entwicklungsschicksal jeder einzelnen Zelle sowie Hunderte von essentiellen Genen bekannt<sup>8-11</sup>. Darüber hinaus ist *C. elegans* ein besonders gutes Modell für die Erforschung der posttranskriptionellen Regulation in der frühen Embryonalentwicklung: Experimente haben gezeigt, dass die RNAPII zwar schon vom Vierzell-Stadium an transkribiert, die Genprodukte aber erst nach der Gastrulation für den Embryo essentiell werden<sup>12</sup>. Das relativ kleine (~100 Mbp-)Genom des Wurms – das erste vollständig sequenzierte Genom eines Vielzellers – ist vergleichsweise gut verstanden und annotiert. Darüber hinaus sind viele molekularbiologische Methoden, wie zum Beispiel der RNAi-Knock-down sowie die Expression von Transgenen und Fusionsproteinen, im Wurm etabliert. Dadurch können Studien zur Genfunktionen verhältnismäßig einfach durchgeführt werden.

*C. elegans* kann in großen Mengen mit wenig Aufwand kultiviert werden, Millionen von Eizellen und Embryonen mit einfachen Standardmethoden aus den Würmern isoliert werden. Der Wurm trägt jedoch Embryonen unterschiedlichen Alters – von der einzelligen Zygote bis zur schlüpfenden Larve mit 558 Zellen. Für molekulare Analysen der Embryonalentwicklung mussten bislang die Embryonen daher nach Alter und Stadium manuell unter dem Mikroskop sortiert werden. Mit dieser zeitaufwendigen Methode wird aber nur eine geringe Anzahl von Embryonen erhalten, mit der nur mikroskopische Untersuchungen, RT-PCR-Analysen und Expressionsanalysen mit Arrays durchgeführt werden können<sup>13</sup>. Für Studien der Embryonalentwicklung mit modernen Hochdurchsatzmethoden, wie etwa Sequenzierungen des Transkriptoms oder Analysen des kompletten Proteoms mittels Massenspektrometrie, wird viel mehr Ausgangsmaterial (Protein und RNA) benötigt. Grob geschätzt braucht man 100.000 Embryonen der jeweiligen Zellstadien dafür – Mengen, die sich mit herkömmlichen Methoden nicht erreichen lassen.



**Abb 1:** eFACS hat routinemäßig eine Ausbeute von zehntausenden Embryonen mit einer Reinheit größer als 98%. A. Scatterplot der ersten Sortierung von einzelligen OMA-1-GFP-Embryonen. Die GFP-positive Population (3-7%) wird selektiert und sortiert. B. Die GFP-positive Population hat nach der ersten Sortierung eine Reinheit von 70% und wird erneut sortiert. Die Reinheit der zweifach sortierten GFP-positiven Population wird dann durch mikroskopische Untersuchung (C und E) und RT-PCRs untersucht. Diese bestätigen eine Reinheit von mehr als 98% einzelligen Embryonen. (Bild aus [1], © Nature Methods)

# GRÜNDER NACH VORN!



Die Startbahn Gründerwettbewerbe.Med unterstützen Sie auf dem Weg von der Geschäftsidee zum erfolgreichen Unternehmen in der Zukunftsbranche Medizinerwirtschaft.



## Businessplan Wettbewerb Medizinerwirtschaft

Wir begleiten Sie in nur vier Monaten von der innovativen Geschäftsidee zum tragfähigen Businessplan.



## Benchmark Award.Med NRW

Wir führen Sie in das Steuerungselement Benchmarking ein und unterstützen Sie in der schwierigen Phase des Unternehmensaufbaus.



## Venture.Med NRW Investorenforum

Wir geben Ihnen die Chance, Ihre Geschäftsidee vor speziell an der Medizinerwirtschaft interessierten Investoren zu präsentieren.

Nutzen Sie Ihre Chance! Wir bringen Sie nach vorn!  
Mit uns können Sie nur gewinnen.



STARTBAHN  
Gründerwettbewerbe.Med  
EMOTION BRAUCHT STRATEGIE

Gefördert durch



EUROPÄISCHE UNION  
Investition in unsere Zukunft  
Europäischer Fonds  
für regionale Entwicklung

Die Landesregierung  
Nordrhein-Westfalen



Jetzt informieren und anmelden!

Fon: 0201/240 535-0; Mail: [info@startbahn-ruhr.de](mailto:info@startbahn-ruhr.de)

[www.startbahn-ruhr.de](http://www.startbahn-ruhr.de)

### Stadiumspezifisches Sortieren von Embryonen mittels eFACS

Um dieses Problem zu lösen, haben wir eine Methode entwickelt, mit der zehntausende Embryonen gleichen Entwicklungsstadiums innerhalb kurzer Zeit mithilfe eines Zellsortierers isoliert werden können (eFACS). Grundvoraussetzung für das Verfahren ist ein Wurmstamm der ein fluoreszierendes Fusionsprotein exprimiert, das stadiumspezifisch im Embryo hergestellt wird. Wir haben eFACS mit einem transgenen *C. elegans*-Stamm etabliert, der ein OMA-1-GFP-Fusionsprotein exprimiert. OMA-1 wird in jungen Eizellen exprimiert und spielt dort im Reifeprozess eine Schlüsselrolle. Nach der Befruchtung der Eizelle, während der ersten Zellteilung der Zygote wird das Protein abgebaut. Im Zweizellstadium sind nur noch etwa 10% des Proteins vorhanden, im Vierzellstadium ist es vollständig verschwunden. Diese Eigenschaften ermöglichen das spezifische Selektieren und Sortieren der einzelligen fluoreszierenden Embryonen mit einem Zellsortierer.

Eine gemischte Embryonalpopulation besteht aus etwa 3% bis 7% einzelligen Embryonen. Diese können mit dem Zellsortierer auf etwa 70% angereichert werden. Die etwa 30% Verunreinigung durch ältere Embryonen ist für sensitive Hochdurchsatzmethoden oft noch nicht akzeptabel. Um einen höheren Reinheitsgrad zu erzielen, war es daher notwendig, die Embryonen ein zweites Mal zu sortieren. Die erste Zellteilung der *C. elegans*-Embryonen dauert etwa 40 Minuten und macht einen zweiten Sortierschritt unmöglich, selbst wenn die Zellteilung durch Kühlung verlangsamt wird. Um dieses Problem zu umgehen, fixierten wir die Embryonen mit Methanol. Diese Fixierung hat zwei Vorteile: Erstens erlaubt sie mehrere zeitunabhängige Sortierschritte, und zweitens werden so Veränderungen des Proteoms und Transkriptoms minimiert, die möglicherweise durch das Sortieren hervorgerufen werden. Außerdem konnten wir zeigen, dass die Methanol-Fixierung die Isolierung intakter RNA erlaubt und diese vergleichbar mit der RNA nicht fixierter Embryonen ist. Ein zweiter Sortierdurchlauf reicht die einzelligen Embryonen auf mehr als 98% an (Abb. 1). Die Sensitivität des Zellsortierers erlaubt es darüber hinaus, zwei- bis vierzellige Embryonen in ausreichender Reinheit zu sortieren (80% 2-4-zellige-, 15% einzellige-, 5% ältere Embryonen). Wir konnten mit eFACS routinemäßig eine Ausbeute von zehntausenden Embryonen erzielen.

### Differentielle Expressionsprofile kleiner nichtkodierender RNAs

Um die Expressionsprofile der kleinen, nicht kodierenden RNAs zu messen, isolierten wir mit eFACS angereicherte einzellige sowie zwei- bis vierzellige Embryonen. Außerdem gewannen

wir mit einer bereits beschriebenen Methode<sup>14</sup> Eizellen aus sterilen Würmern. Wir ermittelten in allen Proben die Profile der kleinen, nicht kodierenden RNAs mittels ultraschneller Sequenzierung (Illumina; 5' ligationsabhängiges Protokoll). Die Analyse dieser Proben erlaubte uns erstmals Einblicke in die Aktivitätsdynamik von kleinen nicht-kodierenden RNAs in einem Zeitfenster von etwa 30 Minuten der frühen Embryonalentwicklung.

Vielleicht überraschend zeigten unsere Daten, dass etwa 60% aller bekannten miRNAs in Eizellen und in frühen Embryonen exprimiert sind. Wir beobachteten relativ geringe Unterschiede in den Transkriptomen der verschiedenen Stadien. Bemerkenswerterweise stellten wir aber fest, dass die reifen miRNAs des miR-35-Clusters (miR-35-miR-41) im Einzellstadium höher exprimiert sind als in den Eizellen oder im Zwei- bis Vierzellstadium. Dies könnte auf eine Prozessierung der prä-miRNA dieses Clusters nach der Befruchtung der Eizelle hindeuten. Außerdem beobachteten wir, dass die Expression von miR-58 im Zwei- bis Vierzellstadium stark ansteigt. Dies deutet darauf hin, dass diese miRNA in diesem Stadium spezifisch prozessiert wird oder sie eine der ersten neutranskribierten miRNAs ist – miR-58 ist ein Ortholog der *bantam*-miRNA, welche in der Entwicklung der Fruchtbliege Zelldifferenzierungsprozesse steuert. Neben bekannten miRNAs konnten wir auch eine Reihe bisher nicht beschriebener miRNAs mit einem in unserem Labor etabliertem Algorithmus (miRDeep<sup>15</sup>) in den Sequenzierdatensätzen identifizieren.

Neben miRNAs beobachteten wir ebenfalls eine dynamische Expression anderer kleiner, nicht kodierender RNAs: Unsere Daten zeigen zum Beispiel einen drastischen Anstieg der 21U-RNAs im Einzellstadium. Die Rolle dieser kleinen RNAs, welche wie die piRNAs in anderen Spezies mit PIWI-Proteinen assoziiert sind, ist in *C. elegans* bisher unbekannt. Darüber hinaus beobachteten wir verschiedene endogene siRNAs und 26G-RNAs in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien.

### Zusammenfassung und Ausblick

Grundsätzlich kann eFACS für die Isolierung großer Mengen an *C. elegans*-Embryonen jedes beliebigen Embryonalstadiums eingesetzt werden. Dadurch eröffnet die Methode das Tor zur Erforschung der Embryonalentwicklung mit modernen Hochdurchsatzmethoden. Als weitere Anwendung sei genannt, dass wir in Zusammenarbeit mit dem Labor von Matthias Selbach (MDC) eine neue Methode entwickelt haben, die es erlaubt, die Aktivität Tausender von Proteinen zweier beliebiger *C. elegans*-Proben zu quantifizieren. Wir nutzen dieses Verfahren unter anderem für Studien des Proteoms der Oozyten/Embryo-Transition und der frühen Embryonalentwicklung. Wir konnten mit dieser Methode die Expressionsdynamik von etwa

3.000 Proteinen in diesen Stadien messen und gleichen diese zur Zeit mit mRNA- und miRNA-Expressionsdaten ab. Damit erhoffen wir uns, die posttranskriptionellen Vorgänge, die zum Beispiel durch miRNAs reguliert werden, während der Embryonalentwicklung besser zu verstehen.

### Danksagung

Diese Arbeit ist Teil meiner Promotion in der Gruppe von Nikolaus Rajewsky am MDC. Ich danke meinem Kollegen Jonas Maaskola, Co-Erstautor der Nature Methods-Publikation, der alle bioinformatischen und statistischen Analysen durchführte. Meine Promotion wird seit 2009 durch das MDC/BIMSB/NYU-Austauschprogramm gefördert ([www.mdc-berlin.de/en/bimsb/index.html](http://www.mdc-berlin.de/en/bimsb/index.html)). Diese Arbeit ist Teil einer langjährigen Kollaboration mit Fabio Piano (NYU, USA).

### Literatur

- [1] Stoeckius, M., Maaskola, J., Colombo, T., Rahn, H.P., Friedländer, M.R., Li, N., Chen, W., Piano, F., Rajewsky, N., Nature Methods 6 (2009), 745-751
- [2] Casanova, J. and Struhl, G., Genes & Development 3 (1989), 2025-2038.
- [3] Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F. A. and Robl, J. M., Science 280 (1998), 1256-1258.
- [4] Davidson, E. H. (1986). Gene Activity in Early Development. New York: Academic Press.
- [5] Giraldez, A.J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R.J., Van Dongen, S., Inoue, K., Enright, A.J. and Schier A.F., Science 312 (2006), 75-79.
- [6] Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillye, D.L., Fire, A., Ruvkun, G., Mello, C.C., Cell 106 (2001), 23-34.
- [7] Martello, G., Zacchigna, L., Inui, M., Montagner, M., Adorno, M., Mamioli, A., Morsut, L., Soligo, S., Tran, U., Dupont, S., Cordenonsi, M., Wessely, O. and Piccolo, S. Nature 449 (2007), 183-188
- [8] Sulston, J.E., Schierenberg, E., White, J.G. and Thomson, J.N., Developmental Biology 100 (1983), 64-119
- [9] Oegema, K. and Hyman, A.A. (2006) Cell division, WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.72.1, <http://www.wormbook.org>
- [10] Sönnichsen, B., Koski, L.B., Walsh, A., Marschall, P., Neumann, B., Brehm, M., Alleaume, A.M., Artelt, J., Bettencourt, P., Cassin, E., Hewitson, M., Holz, C., Khan, M., Lazik, S., Martin, C., Nitzsche, B., Ruer, M., Stamford, J., Winzi, M., Heinkel, R., Röder, M., Finell, J., Häntsch, H., Jones, S.J., Jones, M., Piano, F., Gunsalus, K.C., Oegema, K., Gönczy, P., Coulson, A., Hyman, A.A. and Echeverri, C.J., Nature 434 (2005), 462-469
- [11] Gönczy, P. and Rose, L.S. (2005) Asymmetric cell division and axis formation in the embryo. WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.30.1, <http://www.wormbook.org>.
- [12] Seydoux G, Dunn MA., Development 124 (1997), 2191-201.
- [13] Baugh, L.R., Hill, A.A., Slonim, D.K., Brown, E.L. and Hunter, C.P., Development 130 (2003), 889-900.
- [14] Aroian, R.V., Field, C., Pruliere, G., Kenyon, C. and Alberts, B.M., EMBO 16 (1997), 1541-1549.
- [15] Friedländer MR, Chen W, Adamidi C, Maaskola J, Einspanier R, Knespel S, Rajewsky N. Nature Biotechnology 26 (2008), 407-415

### Korrespondenzadresse

Marlon Stoeckius  
Berlin Institute for Medical Systems Biology  
MDC-Berlin  
Robert-Rössle-Str. 10; 13357 Berlin  
marlon.stoeckius@mdc-berlin.de

# Hochdurchsatz-Screening von Wirkstoff- und Signalweg-Interaktionen

Daniel F. Gilbert, Andreas Jaedicke und Michael Boutros;  
Deutsches Krebsforschungszentrum und Universität Heidelberg

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist eine inzwischen weit angewendete Methode, um die Funktion von Genen in humanen Zellen und Modellorganismen zu untersuchen. Durch den Einsatz kleiner doppelsträngiger RNAs kann gezielt die Expression von Genen unterdrückt werden, um die Auswirkungen auf messbare Prozesse, wie Zellproliferation, Aktivitäten von Signalwegen oder auch Interaktionen mit Wirkstoffen zu bestimmen. Genauer betrachtet ist RNAi ein zellulärer Prozess, bei dem die mRNA durch in die Zelle eingeschleuste, komplementäre RNAs zur Degradation durch den RISC-Proteinkomplex markiert wird. RNAi kann zum Abschalten einzelner Gene eingesetzt werden, die Verfügbarkeit sehr großer RNAi-Bibliotheken ermöglicht aber zudem, Genom-weit nach neuen Faktoren in Signalwegen oder anderen zellulären Prozessen zu suchen<sup>1</sup>. Die neuen Möglichkeiten des RNAi-Screenings haben zu einer Vielzahl von Publikationen geführt, die den erfolgreichen Einsatz der Technologie beschreiben. In diesem Beitrag möchten wir insbesondere auf neue Assays und Auswerteverfahren sowie den kombinatorischen Einsatz zur Identifikation von Wirkstoff-Signalweg-Interaktionen eingehen.

Durch den Einsatz von Hochdurchsatz-Screening-Verfahren werden in kurzer Zeit sehr viele RNAi-Reagenzien getestet. Die Methoden ähneln häufig Verfahren, die im Compound-Screening angewandt werden, weisen jedoch auch spezifische Unterschiede dazu auf.

## Hochdurchsatz-Screening zur Analyse der Aktivität von Signalwegen

Zellbasierte Screenings werden in Mikrotiterplatten mit 384 Vertiefungen durchgeführt, in denen jeweils ein eigenes RNAi-Experiment stattfindet. Gescreent wird mittels automatisierter Flüssigkeitsdispenser und Pipettierroboter, die siRNAs und Zellen in Platten vorbereiten und automatisiert verarbeiten. Durch diese Automatisierung können ganze Genome innerhalb weniger Tage durchgemustert werden. Der Erfolg eines Screens hängt entscheidend von der Qualität des entwickelten zellbasierten Assays ab. Häufig eingesetzt werden Fluoreszenz- oder Lumineszenz-Reporter-Assays, die zum Beispiel die Aktivität von Signalwegen bestimmen. Multiplex-Screening-Verfahren erlauben durch den Einsatz von Fluoreszenzmarkern unterschiedlicher Farben die parallele Analyse mehrerer zellulärer Messgrößen. Verallgemeinert lässt sich feststellen, dass die Assay-Entwicklungsphase eines Hochdurchsatzscreens ein hohes Maß an Originalität und Qualitätskontrolle erfordert – ein guter Assay ist Gold wert, werden doch Fehler oder Kompromisse in der Assay-Entwicklung in den Screening-Resultaten deutlich sichtbar. Wich-

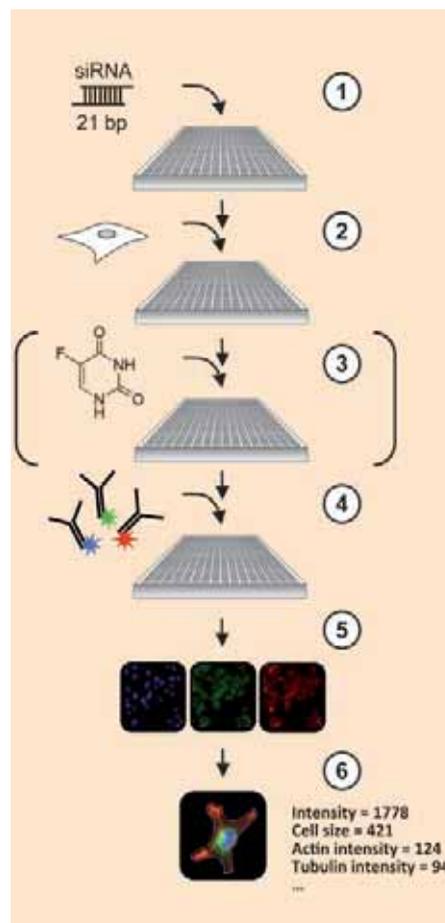


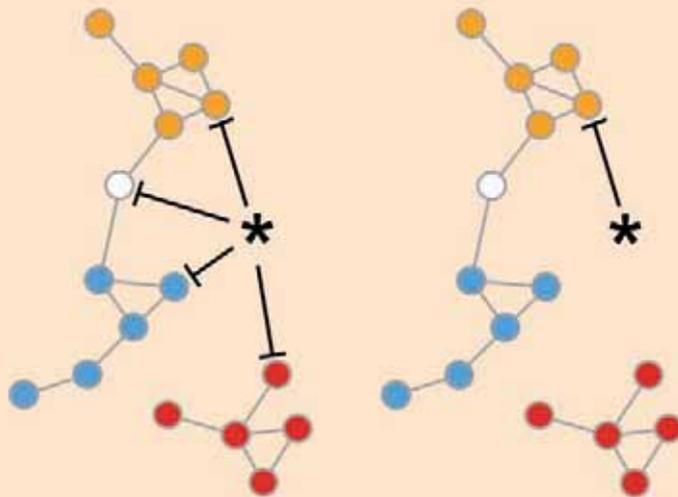
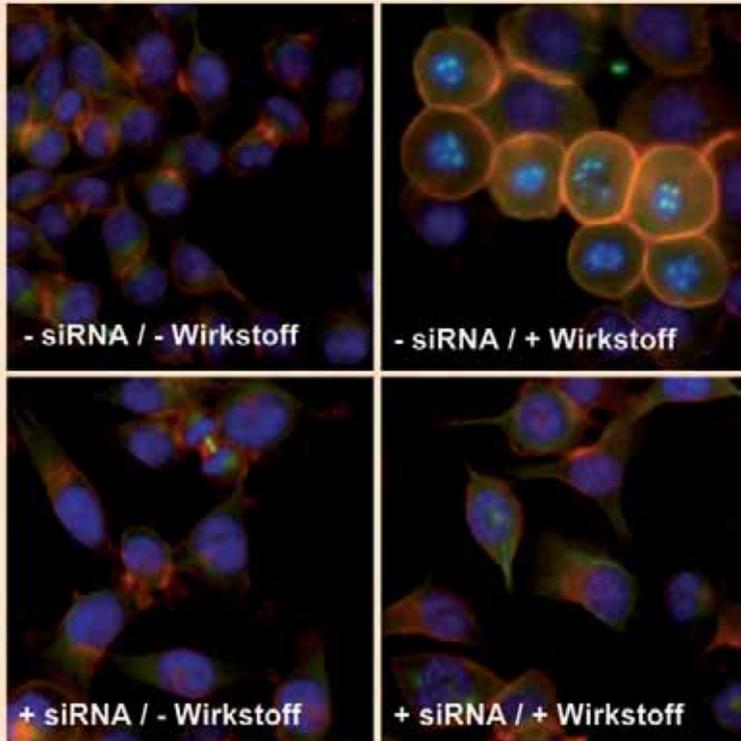
Abb 1: Schematischer Ablauf von Screening-Experimenten. Siehe Text für die Beschreibung der einzelnen Schritte

tige Parameter bei der Entwicklung sind unter anderem die Auswahl einer geeigneten Zelllinie, das Handling und die Kulturbedingungen von Zellen, die Minimierung und Optimierung von Pipettierschritten, die Variabilität erzeugen, die Identifikation geeigneter Positiv- und Negativ-Kontrollen und das stringente Austesten der Screening-Bedingungen. Pilot-Screens mit einer begrenzten Anzahl an Einzelexperimenten werden dann durchgeführt, um die Güte des Assays unter möglichst realistischen Bedingungen zu testen. Die Assay-Qualität wird häufig über einen sogenannten Z'-Faktor evaluiert. Allerdings spielen auch weitere quantitative Faktoren, wie das Signal-Rausch-Verhältnis, die Hit-Rate in Pilot-Screens und die Re-Validierung bekannter Komponenten bei der Einschätzung eine Rolle. Herausforderung bei der Optimierung von Assays sind zum Beispiel die Vermeidung von Rand-Effekten in Mikrotiterplatten, die Standardisierung der Kulturbedingungen für Zellen vor und während der Screens und die Eingrenzung der „biologischen“ Variabilität des verwendeten Assay-Systems.

Ein typischer Ablauf eines Hochdurchsatz RNAi-Screens (siehe Abb. 1, Schritte 1, 2, 4-6) sieht so aus, dass siRNAs in nanomolaren Konzentrationen in Mikrotiterplatten vorgelegt werden. Diese Platten werden für längere Zeit bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und bei Bedarf aufgetaut. Mit Hilfe von Flüssigkeitsdispensern (z.B. Multidrop Combi) wird das Transfektionsreagenz sowie danach Zellen in geeigneter Dichte zugegeben. Nach zwei bis fünf Tagen Inkubation – abhängig von dem jeweiligen Assay – werden die Zellen für das Auslesen prozessiert. Insgesamt können genomweite RNAi-Screenings mit mehr 40.000 Messpunkten innerhalb weniger Tage durchgeführt werden.

## High-Content-Screening

Screening-Verfahren mit homogenen Assays – zum Beispiel Lumineszenz-basierte Assays zur Analyse der Signalweg-Aktivität oder zytotoxischer Effekte in RNAi-Experimenten – haben den Vorteil eines schnellen Abschlusses des Screens, allerdings auf Kosten einer sehr begrenzten Auflösung der Phänotypen. Alternativ lassen sich Zellen nach RNAi durch spezifische Immunfluoreszenz-Marker anfärben und über automatisierte Mikroskopie visualisieren. Für gering aufgelöste Bilder bieten sich auch Plattenzytometer an, wie der Acumen Explorer eX3 (TTP LabTech). Dieser mit bis zu drei Lasern ausgestattete „Plattenscanner“ eignet sich gut für die Multiplex-Analyse mehrerer Fluoreszenz-Kanäle. Eine Zellerkennung erlaubt die Bestimmung der Zellzahl und die Lokalisierung intrazellulärer Bestandteile. Gleichwohl erreicht die automatische Mikroskopie eine wesentlich höhere Auflösung, allerdings wird die Phase der Datenakquisition länger. Genom-weite RNAi-Screenings mit



**Abb. 2:** A. Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (20x Objektiv; blau: Zellkern; grün: Tubulin; rot: Aktin) von Krebszellen. In der oberen Reihe sind untransfizierte Zellen gezeigt, die jeweils für 24 Stunden in DMSO (links) oder in dem Wirkstoff (rechts) inkubiert wurden. Die Wirkstoffbehandlung induzierte die Bildung multipolarer Spindeln und hatte ein Absterben der Zellen zur Folge. In der unteren Reihe sind Zellen dargestellt, die mit einem siRNA-Pool transfiziert wurden. B, C. Schematische Darstellungen von Wirkstoffinteraktionen mit Signalwegproteinen. Legende: Protein (O, Proteine eines Signalwege sind durch gleichfarbige Kreise repräsentiert), weiße Kreise stellen Proteine dar, die verschiedene Signalwege verbinden), Protein-Protein Interaktion (-), Wirkstoff (\*), inhibitorische Wirkstoff-Protein Interaktion (-). B. Ein unspezifischer Wirkstoff hat viele Ziele und inhibiert Proteine mehrerer Signalwege oder Proteine, die verschiedene Signalwege miteinander verbinden. Solche Wirkstoffe haben außer der erwünschten Effekte auch weitere, unerwünschte Nebenwirkungen. C. Ein spezifischer Wirkstoff interagiert nur mit einem Signalweg und greift nicht direkt in benachbarte Signalwege ein. Kombinatorische Experimente können spezifische Wirkstoffe identifizieren, außerdem ist es mit ihrer Hilfe möglich, die Spezifität bereits bekannter Wirkstoffe gezielt zu verbessern.

Hilfe hochauflösender Mikroskopie-Verfahren können sehr leicht mehrere Terabyte an Bild-daten erzeugen.

### Analyse von Hochdurchsatz-Screens

Ziel einer gerichteten Datenanalyse muss es sein, Screening-Rohdaten zu prozessieren und signifikante „Hits“ aus Primärscreens zu identifizieren. Für die Analyse wird bei uns das Softwarepaket cellHTS2 eingesetzt (siehe auch <http://web-cellHTS2.dkfz.de>), das eine vollständige Verarbeitung von High-Throughput-Screening-Daten ermöglicht. Der Vergleich zwischen verschiedenen Screens lässt Rückschlüsse auf die Spezifität der ermittelten Phänotypen zu. Zum Beispiel zeigen Phänotypen von COPB2 – ein Gen, das an dem Transport von Vesikeln beteiligt ist – in vielen verschiedenen Screens Effekte, die die essentielle Funktion von COPB2 in verschiedenen Zelltypen belegen (siehe GenomeRNAi-Datenbank <http://rnaiz.dkfz.de/GenomeRNAi/genedetails/9276>).

### Identifikation von Wirkstoff-Phänotyp-Interaktionen mittels RNAi

Ein Anwendungsbeispiel, das wir hier näher erläutern möchten, ist der Einsatz genomweiter RNAi-Screens zur Identifizierung von Wirkstoffmechanismen. Für die Krebstherapie werden Wirkstoffe entwickelt, die das gezielte Absterben der Krebszellen zum Ziel haben, während normale Körperzellen möglichst wenig angegriffen werden. Ziel ist es häufig, Gene zu identifizieren, welche die Wirkung von Therapeutika in Krebszellen verstärken, um neue Kombinationstherapien zu ermöglichen. Während der Wirkstoffbehandlung und der dadurch induzierten Verwandlung einer Krebszelle in eine absterbende Zelle erzeugt jeder Wirkstoff einen charakteristischen Phänotyp der in einer veränderten Morphologie der Krebszelle resultiert. Dieser Phänotyp kann durch eine Sensibilisierung für den Wirkstoff verstärkt werden und ein schnelleres Absterben der Krebszellen zur Folge haben. Neben den „synthetisch letalen“ Effekten auf Krebszellen, ist auch die Unterdrückung der Wirkstoff-Phänotypen interessant, da sie Rückschlüsse auf mögliche Chemo-Resistenzfaktoren ermöglichen. Die Entstehung von Wirkstoffresistenz ist ein Hauptproblem bei der Behandlung von Krebs. Die ihr zugrundeliegenden Mechanismen sind in vielen Fällen nicht verstanden. RNAi mit kultivierten, humanen Krebszelllinien in Kombination mit der Wirkstoffbehandlung können dazu beitragen, diese Mechanismen zu entschlüsseln

und neue Wirkstoff-Target- Interaktionen zu identifizieren<sup>3,4</sup>. Die bereits beschriebenen fluoreszenzmikroskopischen Verfahren dienen hierbei als Hilfsmittel, um Veränderungen der Zellen zu untersuchen und die Sensibilisierung für Wirkstoffe oder die Entwicklung von Wirkstoffresistenz zu detektieren.

Um in unserem Labor kombinatorische Experimente mit Krebsmedikamenten und siRNAs im Hochdurchsatz-Format durchführen zu können, haben wir Protokolle etabliert (siehe Abb. 1) und Proof-of-principle-Studien durchgeführt (siehe Abb. 2). Hierfür wurden Krebszellen mit einem Wirkstoff behandelt und parallel mit selektierten siRNAs transfiziert. Die Datenanalyse konnte eine Anzahl von Genen identifizieren, die für Zielproteine des Wirkstoffs kodieren. RNAi gegen diese Gene konnte den Wirkstoff-Phänotyp unterdrücken (siehe Abb. 2A) oder eine Resistenz für den verwendeten Wirkstoff simulieren.

### Experimenteller Ansatz: Proof-of-principle-Studie

Für die kombinatorische Studie wurde eine Bibliothek aus selektierten siRNAs in vier Replikaten pro siRNA (Dharmacon) aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zu ihrem Einsatz aufbewahrt (Abb. 1, 1). Dann wurden die eingefrorenen siRNAs aufgetaut, mit Transfektionsreagenzien gemischt und jedes Well mit einer definierten Anzahl an Zellen bestückt (Abb. 1, 2). Nach 24 Stunden Inkubation wurden der Wirkstoff und eine Negativkontrolle (DMSO) in jeweils zwei Wells pro siRNA pipettiert und für weitere 24 Stunden inkubiert (Abb. 1, 3). Nun wurden die transfizierten und mit Wirkstoff oder DMSO behandelten Zellen fixiert, permeabilisiert und mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gefärbt um Zellkern, Aktin-Filamente und Mikrotubuli darzustellen (Abb. 1, 4). Für die Analyse der generierten Bilddaten (Abb. 1, 5) und die Quantifizierung der Zellmorphologie (Abb. 1, 6) wurde eine in unserem Labor entwickelte Software verwendet. Die auf diese Weise in numerische Werte übersetzten Bilddaten wurden anschließend mit der cellHTS2-Software statistisch analysiert.

### Fazit

Zusammengenommen zeigen die Daten unserer und anderer Studien, dass kombinatorische Experimente geeignet sind, um neue Wirkstoff-Protein-Interaktionen zu identifizieren und die Mechanismen der Resistenzentwicklung und Sensibilisierung für die Wirkstoffbehandlung zu entschlüsseln. Weiterhin hat der kombinatorische Ansatz das Potential, spezifische Wirkstoffe zu identifizieren, die Selektivität bereits bekannter Wirkstoffe zu evaluieren und diese gezielt auf eine verbesserte Selektivität hin zu modifizieren.

### Literatur

- [1] Boutros M, Ahringer J. (2008). Nature Review Genetics 9:554-566.
- [2] Boutros M, Bras LP, Huber W. (2006). Genome Biol. 7:R66.
- [3] Swanton C, Marani M, Pardo O, Warne PH, Kelly G, Sahai E, Elustondo F, Chang J, Temple J, Ahmed AA, Brenton JD, Downward J, Nicke B. (2007). Cancer Cell 11:498-512.
- [4] Whitehurst AW, Bodemann BO, Cardenas J, Ferguson D, Girard L, Peyton M, Minna JD, Michnoff C, Hao W, Roth MG, Xie XJ, White MA (2007). Nature 446:815-9.

### Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Michael Boutros  
Deutsches Krebsforschungszentrum und Universität Heidelberg  
Abteilung Signalwege und Funktionelle Genomik (B110)  
Im Neuenheimer Feld 580  
D-69120 Heidelberg  
m.boutros@dkfz.de  
www.dkfz.de/signaling



## Weißer als weiß?

Selbst die weißesten Mikroplatten wurden unter Umständen mithilfe von Fremdstoffen hergestellt, was Auswirkungen auf die Genauigkeit von Analyseergebnissen haben kann – bei den Mikroplatten von Porvair Sciences ist dies nicht der Fall. Rufen Sie uns an, senden Sie eine E-Mail oder besuchen Sie uns unter [www.porvair-sciences.com/downloads.php](http://www.porvair-sciences.com/downloads.php) und fordern Sie Ihre Kopie eines unabhängigen Artikels und eine Probe unserer Mikroplatten an, um die Ergebnisse mit Ihrer aktuellen Marke vergleichen zu können.

**porvair**  
sciences

Porvair Sciences Ltd

Telephone +44 (0)1372 824290 Email: [int.sales@porvair-sciences.com](mailto:int.sales@porvair-sciences.com)



[www.jobboerse.bio-sell.de](http://www.jobboerse.bio-sell.de)

**exklusiv für den Life Science und Biotech Markt**

- einfach und unkompliziert
- günstige Konditionen
- hohe Multiplikatorenzahl
- Beratungsservice

**Sie finden hier Jobs für**

- Wissenschaftler und Postdocs
- Doktoranten, Technische Assistenz
- Vertrieb und Marketing
- Spezialisten

**BIO & SELL**  
FÜR EFFEKTIVES FORSCHEN

Tel.: 09128/724 32 32

Fax: 09128/724 32 33

Mail: [jobs@bio-sell.de](mailto:jobs@bio-sell.de)

[www.jobboerse.bio-sell.de](http://www.jobboerse.bio-sell.de)

[www.bio-sell.de](http://www.bio-sell.de)

# RNAi-Screens in der funktionellen Pathogenomforschung

Peter R. Braun, Alexander Karlas, André P. Mäurer, Thomas F. Meyer, Nikolaus Machuy, Abteilung Molekulare Biologie, Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin

Infektionen stellen ein permanentes Wechselspiel zwischen Pathogen und Wirt dar. Dabei hängt insbesondere die Vermehrung von Viren, aber auch vieler Bakterien und Parasiten von den Wirtszellen ab. Das durch RNAi-Screens gewonnene Wissen um die Wirtszellfaktoren, von denen die Pathogenreplikation abhängt, wird zu einem verbesserten Verständnis der Infektionsprozesse beitragen. Der hier vorgestellte Screen nach für die Influenza-Virusreplikation relevanten Wirtszellfaktoren belegt, wie auch entsprechende Arbeiten anderer<sup>1-3</sup>, dass es mit Hilfe von RNAi-Screens möglich ist, die an parasitären, bakteriellen und viralen Infektionsprozessen beteiligten Wirtszellfaktoren zu identifizieren und damit zur Entwicklung innovativer Medikamente beizutragen.

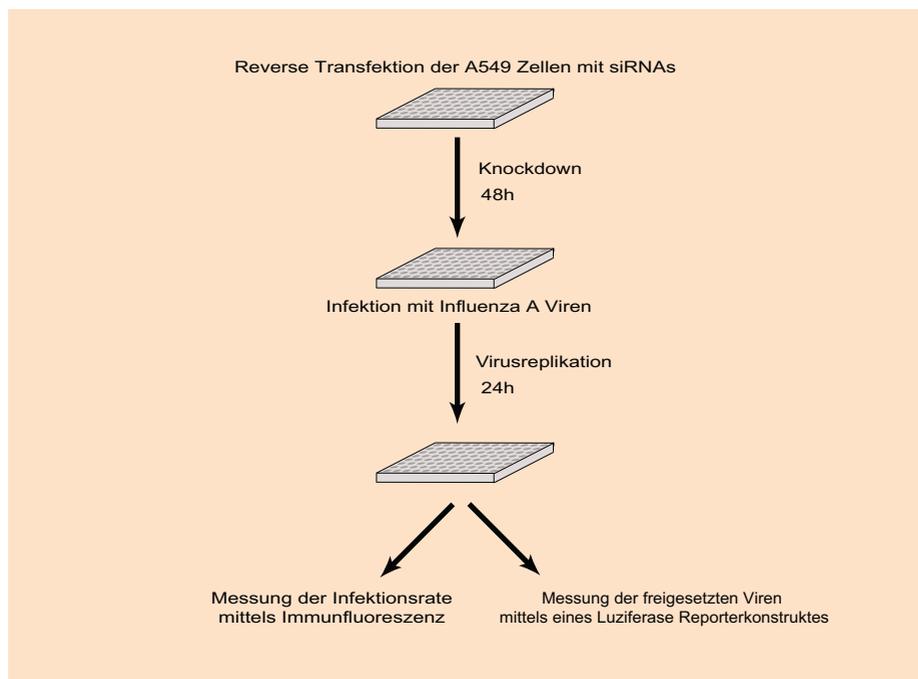
Die RNA-Interferenz (RNAi) hat sich in den vergangenen Jahren als sehr hilfreiches Werkzeug in der funktionellen Genomanalyse durchgesetzt<sup>4</sup>. Bei der RNAi handelt es sich um einen natürlich auftretenden Mechanismus der Genregulation und der Infektionsabwehr. Durch das Einbringen oder die intrazelluläre Expression von 21 bis 23 Basenpaaren langen, doppelsträngigen RNAs (small interfering RNAs, siRNAs) führt RNAi zum sequenzspezifischen Abbau

von mRNA, der – mit einer gewissen Verzögerung – der Verlust des entsprechenden Proteins folgt. Somit erhält man eine Zelle, der genau ein Protein fehlt. Im Anschluss kann der Einfluss dieses Proteins bei einem bestimmten Vorgang, zum Beispiel der Zellteilung, untersucht werden. Mehrere Eigenschaften der RNAi-Technologie haben dazu beigetragen, dass diese in so kurzer Zeit eine breite Anwendung in loss-of-function-Screens fand: Ein hoher Anteil der siRNAs ist

funktionell, das heißt, diese siRNAs können die Degradierung der mRNA auslösen. Zudem sind viele siRNAs hocheffizient. Dadurch gelingt es in vielen Fällen, Genfunktionen nicht nur partiell, sondern nahezu vollständig zu blockieren. Die Verfügbarkeit von siRNA-Bibliotheken erlaubt es, genomweite RNAi-Screens durchzuführen, was eine umfassende Katalogisierung von Genfunktionen ermöglicht. Voraussetzung für umfangreiche Screens ist allerdings ein hoher Grad an Automation. Hierbei sind vor allen Dingen zwei Aspekte von Bedeutung. Zum einen die Durchführbarkeit an sich: Während einfache Screens mit Dispensiergeräten zu bewerkstelligen sind, werden aufwändige Screens – bei denen zum Beispiel Überstände zwischen Mikrotiterplatten transferiert werden müssen – erst durch komplexere Automationsysteme möglich. Zudem steigern die Pipettierroboter die Reproduzierbarkeit der Pipettierungen signifikant – experimentelle Schwankungen der Ergebnisse werden deutlich reduziert und auch moderate Phänotypen verlässlich nachgewiesen. Schließlich erlauben erst automatisierte Detektions- und Analysensysteme das Erfassen und Auswerten großer Datensätze.

## Automatisierte Hochdurchsatzmikroskopie

Am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie (MPI-IB) wurde das Potential der RNA-Interferenz für funktionelle Genomanalysen sehr früh erkannt und bereits Ende 2001 mit dem Aufbau einer automatisierten RNAi-Screeningplattform begonnen. Inzwischen stehen für Hochdurchsatz-Screens verschiedene Read out-Systeme zur Verfügung. So werden zur molekularen Untersuchung von Infektionsprozessen vor allem die Durchflusszytometrie, hochauflösende laserbasierte Multititerplatten-Scanner und die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Letztere spielt als automatisierte quantitative Hochdurchsatzmikroskopie in Verbindung mit einer leistungsfähigen Bildanalyse-Software (Olympus Scan<sup>®</sup>) eine herausragende Rolle. Durch spezifische Bildanalyse-Assays können viele Parameter getrennt oder miteinander kombiniert analysiert werden, was eine präzise Erfassung der biologischen Situation ermöglicht. Ein einfaches Beispiel ist die Analyse intrazellulärer Chlamydien. Hier wird nicht nur ein einfaches Fluoreszenzsignal gemessen, sondern die Anzahl und der jeweilige Durchmesser jedes einzelnen bakteriellen Einschusses (Inklusion) bestimmt. Aus der Kombination der verschiedenen Parameter lassen sich neue wissenschaftliche Schlussfolgerungen ziehen. Die Entwicklung oder Anpassung mikroskopischer Assays geht dabei Hand in Hand mit der Assayentwicklung im Labor, und wie die Assayentwicklung im Labor stellt die automatische Bildanalyse eine Herausforderung dar. Moderne Analyseprogramme bieten beispielsweise vielfältige Möglichkeiten zur Substraktion



**Abb 1:** Der Ablauf des genomweiten Influenza-RNAi-Screens: Rund 60.000 siRNAs wurden einzeln in A549-Zellen transfiziert und diese Zellen zwei Tage später – nach Einsetzen des „Gene knockdowns“ – mit H1N1-Influenza A-Viren infiziert. Die anschließende Virusreplikation wurde 24 h später mit Hilfe zweier unterschiedlicher Methoden analysiert: der prozentuale Anteil der infizierten A549-Zellen (Infektionsrate) wurde mittels Immunfluoreszenz quantifiziert. Die Menge an infektiösen Influenzaviren konnte mittels eines viruspezifischen Luciferasekonstruktes bestimmt werden.

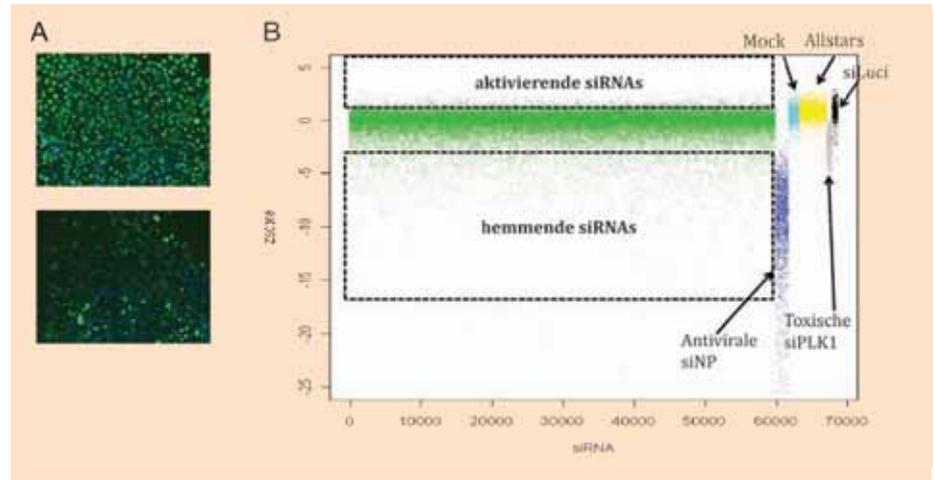
des Bildhintergrundes und zur Verrechnung von verschiedenen Fluoreszenzkanälen. Eine intelligente Einbindung der mikroskopischen Auswertung in die Assayentwicklung lieferte für die von uns durchgeführten Screens stabile und signifikante Datensätze.

Die im Rahmen von genomweiten RNAi-Screens anfallenden Rohbilder und analysierten Datensätze können sich schnell zu mehreren Terabyte aufsummieren. Deshalb wurden am MPI-IB effiziente Datenspeicherungs- und Backupsysteme eingerichtet. Zudem wurde parallel zum laufenden Screeningprozess eine Qualitätsüberwachung der experimentellen Kontrollen sowie der Färbungen etabliert, um Fehler schon während des laufenden Experiments zu finden und zu eliminieren. Insgesamt kommt damit der mikroskopischen Bildanalyse eine ähnlich wichtige Rolle zu wie dem biologischen Experiment selbst.

In Zukunft soll am MPI-IB auch eine besondere technische Herausforderung angegangen werden: RNAi-Screens, bei denen die mikroskopische Analyse fixierter Zellen durch Live cell microscopy – also die Aufnahme von lebenden Zellen über einen längeren Zeitraum – ersetzt wird. Vorteil dieses Verfahrens: Veränderungen, die ausschließlich im zeitlichen Ablauf deutlich werden, aber am Ende des biologischen Prozesses nicht mehr detektierbar sind, können erfasst werden. So kann etwa das Ausschalten eines bestimmten Gens zu einem schnelleren Wachstum eines Pathogens führen, ohne dass am Ende des Infektionsprozesses noch ein Unterschied zur unbehandelten Kontrolle feststellbar ist. Auch Signaltransduktionsprozesse lassen sich so besser analysieren.

### RNAi-Screens

RNAi-Screens dienen verschiedenen Zwecken. In der industriellen Forschung steht meist die direkte Identifizierung potentieller Medikamententargets im Vordergrund. Im akademischen Bereich dominiert oft das Interesse, einen bestimmten biologischen Prozess besser zu verstehen, zum Beispiel die Zellteilung. Dieses bessere Verständnis des Zusammenspiels mehrerer Faktoren kann ebenfalls dazu dienen, potentielle neue Targets abzuleiten. Die am MPI-IB durchgeführten Screens dienen in erster Linie dazu, das Zusammenspiel von Wirt und Pathogen besser zu verstehen. Hierbei fokussie-



**Abb. 2:** A: Beispielbilder für Zellpopulationen mit Kontroll- und antiviraler siRNA. A549-Zellen wurden 48 h vor der Infektion mit siRNAs transfiziert. 5 h nach Infektion wurden die Zellen fixiert und mit einem Antikörper gegen das virale Nucleoprotein, gefolgt von einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper gefärbt. (B) Z-scores des RNAi-Screens Gezeigt sind sowohl die Z-Scores der siRNA-Bibliothek als auch der im Screen eingesetzten Kontrollen. Die gestrichelten Linien rahmen siRNAs ein, die zu einer geringeren (hemmende siRNAs) bzw. zu einer gesteigerten Virenreplikation (aktivierende siRNAs) führten. Allstars und siLuci: Neutralkontrollen ohne zelluläres Zielgen, siPLK1: toxische siRNA, siNP: antivirale siRNA (Zielgen: virales Nucleoprotein).

ren wir uns überwiegend auf die Identifizierung von Wirtszellfaktoren, die einerseits für die Vermehrung intrazellulärer Pathogene notwendig sind, wie etwa von Influenzaviren. Andererseits interessieren wir uns für die von Pathogenen induzierten Signalwege, wie von *Helicobacter pylori* induzierte Prozesse des angeborenen Immunsystems. Schließlich analysieren wir physiologische Veränderungen, die im Zuge einer Infektion auftreten. Hier ist zum Beispiel die Hemmung der Apoptose durch *Chlamydia trachomatis* zu nennen.

### Die Suche nach virusrelevanten Wirtszellfaktoren

Erst kürzlich haben wir am MPI-IB einen genomweiten siRNA-Screen durchgeführt, der bei der Suche nach neuen Influenzamedikamenten helfen wird<sup>2</sup>. Die Wirkstoffe, die bisher gegen Influenza eingesetzt werden, haben nämlich eine entscheidende Schwachstelle: Sie sind alle gegen virale Proteine gerichtet. Derzeit unterscheidet man hier zwischen zwei Wirkstoffklassen, den Neuraminidase-Inhibitoren wie Oseltamivir (Tamiflu) und Zanamivir (Relenza) und den Amantadinen, die das virale M2-Protein

hemmen. Immer häufiger wird beobachtet, dass diese Medikamente wirkungslos bleiben, weil sich das Influenzavirus ständig verändert und schließlich die Virostatika nicht mehr an den viralen Proteinen binden oder deren Funktion nicht mehr vollständig blockieren können. Um diese Gefahr der Resistenzbildung bei der Entwicklung neuer Medikamente zu reduzieren, wurde in einem genomweiten RNAi-Screen nach Wirtszellfaktoren gesucht, ohne die sich Influenzaviren nicht mehr vermehren können (Abb. 1). Um realitätsnahe Versuchsbedingungen für diese sich überwiegend im respiratorischen Trakt ausbreitenden Viren zu schaffen, wurde bei diesen Arbeiten eine immortalisierte humane Lungenepithelzelllinie (A549) eingesetzt. Diese A549-Zellen wurden zunächst mit siRNAs transfiziert, so dass das entsprechende Protein nicht mehr in ausreichender Menge hergestellt werden konnte. Anschließend wurden die Zellen mit einem H1N1-Influenzavirus (A/WSN/33) infiziert und einen Tag später bestimmt, ob die Hemmung des jeweiligen Gens zu einer Reduktion der Virusvermehrung (Abb. 2) geführt hatte. Insgesamt wurden aus 24.000 Genen 287 identifiziert, die an der Virusreplikation beteiligt sind (Abb. 3). Interessanterweise haben erste Tests mit ausgewählten Targets

**Pipettierpower in Ihrer Hand**

für schnelles und einfaches Bearbeiten von 96er und 384er Platten

**www.liquidator96.de**

Steinbrenner Laborsysteme GmbH • In der Au 17 • 69257 Wiesenbach • Tel. 06223 861247





**Abb. 3:** A. Die Hochdurchsatz-Fluoreszenz (HDF)-Mikroskopie besteht aus mindestens fünf Schritten: Probenvorbereitung, Bildaufnahme, Datenspeicherung, Bildanalyse und Datenauswertung. Um einen reibungslosen Versuchsablauf zu ermöglichen, müssen alle HDF-Mikroskopie-Schritte aufeinander abgestimmt und automatisiert werden.

gezeigt, dass deren Funktion nicht nur für saisonale A(H1N1) Influenza-Stämme, sondern auch für die pandemieassoziierten A(H5N1) und die neuen pandemischen A(H1N1)-Influenzaviren unabdingbar ist – also für Viren, die erst vor kurzem durch Neuordnung der Influenza-Gensegmente entstanden sind.

Die gewonnenen Erkenntnisse aus diesem genomweiten RNAi-Screen können nun genutzt werden, um gezielt chemische Wirkstoffe zu suchen, die diese Wirtszellproteine inhibieren. Bisherige Untersuchungen legen nahe, dass solche Medikamente gegenüber herkömmlichen Wirkstoffen zwei Vorteile hätten: Während Viren durch die Mutation einer einzelnen Base gegen Virostatika, die gegen virale Proteine gerichtet sind, resistent werden können, würde die Unterdrückung eines für die Virenreplikation notwendigen zellulären Prozesses eine deutlich höhere Hürde für die Virusreplikation darstellen. Ein antimikrobielles Medikament, das gegen ein zelluläres Protein gerichtet ist, könnte also die Entstehung resistenter Stämme eindämmen. Zudem ist es sehr wahrscheinlich, dass verschiedene Stämme eines Virus oder eines anderen Pathogens von ähnlichen zellulären Prozessen abhängen. Daher sollten diese Wirkstoffe in der Lage sein, auch die Replikation neuer Influenzaviren zuverlässig zu hemmen.

Ebenfalls denkbar erscheint, neben den chemischen Inhibitoren auch die RNA-Interferenz direkt für die antivirale Therapie einzusetzen. Am MPI-IB konnte gezeigt werden, dass die Replikation von Influenzaviren in der Maus durch gegen virale RNA gerichtete siRNAs gehemmt werden kann. Um ihre intrazelluläre Stabilität zu verbessern, wurden diese siRNAs chemisch modifiziert und zusätzlich mit verschiedenen Polymeren konjugiert, damit sie besser in die Zielzellen gelangen. Um zu vermeiden, dass aufgrund der hohen Mutationsrate der Influenzaviren diese Medikamente ihre Wirksamkeit verlieren, könnte man auch hier mittels RNAi die Expression der neu identifizierten Wirtszellfaktoren inhibieren, anstatt das Virus selbst anzugreifen.

### Hochsicherheitslabor für S3-Screens

Bisher konnten RNAi-Screens wie der oben erläuterte Influenza-Screen in Europa nur mit Erregern der Risikogruppe 2 durchgeführt werden. Um auch die gefährlicheren Erreger der Risikogruppe 3 bearbeiten zu können, wurde am MPI-IB – gefördert durch das Bundesforschungsministerium im Rahmen des ERA-Nets PathoGenoMics – eine weitere

Screening-Einheit aufgebaut. Dieses Hochdurchsatzlabor der Sicherheitsstufe 3 (S3) ist in der akademischen Forschung in Europa bisher einzigartig und ermöglicht beispielsweise Arbeiten mit den Erregern von AIDS, Gelbfieber, Typhus, Pest oder Tuberkulose. Die Sicherheitsbestimmungen, die bei der Einrichtung befolgt werden mussten, sind dabei speziell auf gefährliche Erreger zugeschnitten. So finden alle Arbeiten in einer maßgeschneiderten Klasse II-Einhausung statt, die im Falle einer Kontamination samt Pipettierroboter und Peripheriegeräten mit Wasserstoffperoxid (VHP-Verfahren) begast werden kann. Diese Sterilisationsmethode hat den Vorteil, dass sämtliche Erreger abgetötet werden, ohne dass den Geräten Schaden zugefügt wird. Die Screening-Anlage selbst wurde vor allem in Hinblick auf hohen Durchsatz und hohe Geschwindigkeit konzipiert. Das Kernstück ist ein Pipettierroboter (Biomek FX<sup>P</sup>, Beckman Coulter) mit zwei 384-Kanal-Pipettierköpfen, der mit verschiedenen Peripheriegeräten wie automatischen Dispensern und einem Zellkultur-Inkubator verbunden ist. Die Kapazität gestattet die gleichzeitige Bearbeitung von knapp 200 Mikrotiterplatten, und damit zum Beispiel genomweite RNAi-Screens. Bei der Planung der Anlage wurde außerdem auf große Kompatibilität zur am MPI-IB bereits bestehenden S2-Anlage geachtet. Auf diese Weise ist es möglich, dass bestimmte Protokolle und Prozesse unter S2-Bedingungen getestet werden, und erst, wenn ein S3-Erreger ins Spiel kommt, auf der S3-Anlage weitergearbeitet wird. So können beispielsweise Zellkultur-Parameter oder Transfektionsbedingungen im S2-Labor etabliert werden, während erst die Infektion mit dem Pathogen unter S3-Bedingungen stattfindet. Als erste Projekte sollen mit Hilfe der neuen Anlage zum Beispiel Wirt-Pathogen-Interaktionen bei Infektionen mit *Salmonella typhi* oder A(H5N1) Influenzaviren untersucht werden. Neben RNAi-Screens ist auch das Screening von Mutanten-Bibliotheken oder auch von chemischen Verbindungen als Wirkstoffkandidaten möglich.

### Literatur

- [1] A. L. Brass, et al., Cell 139(7), 1243 (2009).
- [2] A. Karlas, et al. Nature (2010).
- [3] R. König, et al., Nature (2009).
- [4] J. Moffat and D. M. Sabatini, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7(3), 177 (2006).

### Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Thomas Meyer  
 Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie  
 Abteilung Molekulare Biologie  
 Charitéplatz 1  
 10117 Berlin  
 Tel./ Fax: +49-(0)30-28460-400 /-401  
 meyer@mpiib-berlin.mpg.de



**Abb. 4:** Die neue Hochsicherheits-Screeningeinheit am MPI für Infektionsbiologie Berlin. In der Klasse II-Einhausung sind ein Plattenhotel und der Pipettierroboter zu erkennen.

# Identifikation von Targetmolekülen kleiner regulatorischer RNAs

Rolf Backofen, Institut für Bioinformatik, Universität Freiburg

Nicht-codierende, kleine RNAs (sRNAs) spielen eine wichtige Rolle in der Genregulation. Studien an prokaryotischen und eukaryotischen Zellen zeigen, dass diese sRNAs häufig über die Paarung komplementärer Basen an mRNA-Zielsequenzen (target mRNA) binden, um die Expression bzw. Translation der entsprechenden Gene zu regulieren. Die Spezifität dieser Interaktionen hängt von der Stabilität der inter- und intramolekularen Basenpaarungen ab. Neue Techniken wie das Deep Sequencing identifizieren zwar extrem viele sRNAs. Da aber keine Hochdurchsatzmethoden zur Verfügung stehen, um die zugehörigen Target-RNAs zu identifizieren und somit den sRNAs eine Funktion zuzuschreiben, und weil die experimentellen Methoden mit großem Aufwand verbunden sind, ist die rechnergestützte Target-Vorhersage, gefolgt von einer experimentellen Analyse vielversprechender Kandidaten der derzeit effizienteste Ansatz, Ziel-RNAs zu identifizieren. Allerdings ist auch die rechnergestützte Vorhersage von Targetsequenzen aufgrund der häufig unvollständigen Sequenzkomplementarität oft eine Herausforderung. Hier beschreiben wir derzeit aktuelle Methoden zur Targetsequenz-Vorhersage.

Die aktuellen Methoden zur Target-Vorhersage basieren auf der Berechnung eines Hybrids der meist kleinen sRNAs mit der vermutlich regulierten Ziel- oder Target-mRNA. Solche Hybride werden von zueinander komplementären Abschnitten der sRNA und der Target-mRNA gebildet. Die verschiedenen Ansätze zur Target-Vorhersage unterscheiden sich in der Art, die Komplementarität zu bewerten, und hinsichtlich der Anzahl der möglichen komplementären Regionen. Im Gegensatz zur microRNA-Targetsuche werden derzeit noch wenige Schritte (wie die Berücksichtigung konservierter Seeds) verwendet, um geeignete Targets herauszufiltern. Dies liegt unter anderem daran, dass zum einen weniger

Daten vorhanden sind, und zum anderen sRNA-mRNA-Interaktionen wesentlich flexibler sind als miRNA-mRNA-Wechselwirkungen. Somit ist es schwieriger, geeignete Merkmale zu finden.

## Sequenzbasierte Ansätze

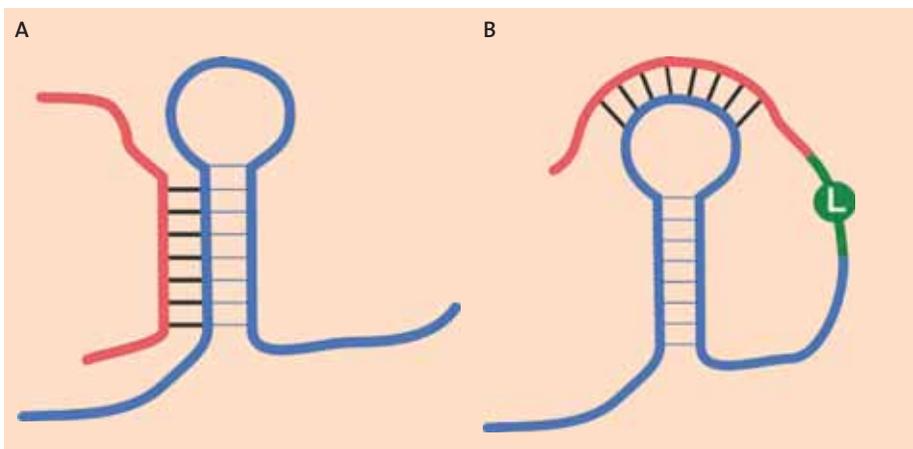
Die einfachsten Modelle zur Bewertung von Hybriden sind rein sequenzbasiert. Obwohl Methoden wie BLAST<sup>2</sup> verwendet werden können, um lange komplementäre Stränge zu finden, scheint dies hier weniger geeignet, da diese G-U-Paare ignorieren. Diese Beschränkung wird aber zum Beispiel durch den GUUGle-Ansatz<sup>12</sup> gelöst. Der einfachste Modus des Vorhersage-

Tools TargetRNA<sup>26</sup> ist ebenso sequenzbasiert. Es hat sich aber schnell gezeigt, dass es wichtig ist, zusätzlich die Stabilität des entstehenden Duplex zu bewerten, da ansonsten Effekte wie der G-C-Gehalt nicht richtig berücksichtigt werden können. Dazu wird ein Nearest-Neighbour-Energiemodell<sup>18</sup> zur Bewertung des Duplex herangezogen, wie es etwa zur Berechnung der energieärmsten Faltung einzelsträngiger RNAs verwendet wurde. Eines der ersten Beispiele für einen solchen Ansatz ist RNAhybrid<sup>22</sup> – auch als RNA duplex im Vienna RNA-Package<sup>13</sup> implementiert –, das für die Vorhersage von microRNA-Targets entwickelt wurde. Etwas später wurde ein ähnlicher Ansatz im „TargetRNA“-Werkzeug für bakterielle sRNAs verwendet. Bei diesen Ansätzen hängt die Bewertung eines Basenpaares (i, k) von dem unmittelbar folgenden Basenpaar (i', k') ab, wobei i eine Position in der mRNA und k eine Position in der sRNA ist. Falls i' = i + 1 und k' = k - 1 handelt es sich – unter der Voraussetzung, dass beide RNAs in 5'→3'-Richtung notiert sind – um eine Anordnung, die energetisch vorteilhaft ist. Ansonsten handelt es sich um einen internen Loop, oder Bulge RNAplex<sup>25</sup> nutzt ein ähnliches Energiemodell, jedoch wird ein einfacheres Modell für die internen Loops verwendet, was zu einer deutlichen Laufzeitreduktion führt.

Die Vorteile dieser Ansätze liegen in ihrer geringen Berechnungskomplexität, in der Vorhersage realistischerer Interaktionen sowie in der Möglichkeit, die statistische Signifikanz eines Hits zu bestimmen. Der Grund hierfür liegt in der Ähnlichkeit dieser Bewertungsmodelle zu lokalen Sequenzalignments. Dadurch können ähnliche Methoden wie im lokalen Sequenzalignment<sup>17</sup> zur Bestimmung der statistischen Signifikanz verwendet werden. Hierbei wird eine Extremwertverteilung an eine empirische Verteilung angepasst, die aus den normalisierten Hybridisierungsscores zufälliger Sequenzen generiert wird. Im Gegensatz zu lokalen Sequenzalignments muss hierbei aber Dinukleotid-Shuffling verwendet werden, da die Verteilung von Dinukleotiden einen wesentlichen Einfluss auf die Stabilität des Duplex hat.

Hauptnachteil dieser Ansätze ist, dass sie keine intramolekularen Basenpaare berücksichtigen. Dies hat zur Folge, dass Interaktionen vorhergesagt werden können, die biologisch nicht möglich sind, da die Interaktion durch eine interne Struktur überdeckt wird (siehe Abb. 1a).

Neuere Verfahren berücksichtigen daher auch die interne Struktur sowohl der sRNA als auch der mRNA, wobei es hier zwei grundsätzlich verschiedene Ansätze gibt. Die erste Klasse besteht aus einem Zwei-Stufen-Modell, in dem aus den Ensembleeigenschaften der beiden RNAs zunächst die Zugänglichkeit (accessibility) der möglichen Interaktionsbereiche im Ensemble aller internen Strukturen bestimmt wird. Hierzu wird die sogenannte Partitionsfunktion benötigt, welche die Sum-



**Abb 1:** A. Biologisch unmögliche Struktur, die durch Verfahren vorhergesagt werden kann, die nur die Energie des interagierenden Duplex bewerten. B. Eine nicht-genestete Struktur, die nicht von Konkatinationsansätzen vorhergesagt werden kann. (aus Backofen & Hess: RNA Biology 7(1), 2010)

me der Boltzmann-gewichteten Energie aller Strukturen  $R$  einer Sequenz  $S$  darstellt, also:

$$Z(S) = \sum_{R \text{ Struktur von } S} e^{-E(S)/RT}$$

Hieraus lässt sich mit Hilfe der Formel  $E_{\text{all}} = -RT \ln(Z(S))$  die Ensembleenergie berechnen. Nun bestimmt man für jedes Paar von Positionen  $i, j$  die Partitionsfunktion aller Strukturen, in denen die Region  $i, j$  frei von interner Struktur und somit zugänglich ist (siehe Figur 2a). Daraus lässt sich dann die Ensembleenergie  $E^{\text{sg}(i, j)}$  aller Strukturen berechnen, die in der Region  $i, j$  eine Interaktion ausbilden können. Die Energiedifferenz  $ED(i, j) = E^{\text{sg}(i, j)} - E_{\text{all}}$  dieser beiden Ensembleenergien – im folgenden ED-Wert genannt – kann als Energie interpretiert werden, die benötigt wird, um eine Region für eine mögliche Interaktion zugänglich zu machen.

### Energiefunktionen

RNAup<sup>20</sup> und IntaRNA<sup>8</sup> verwenden diese Werte, um sRNA-mRNA-Duplexe mit einer kombinierten Energiefunktion zu bewerten. Die Energie eines Duplex entspricht dabei der Summe der Hybridisierungsenergie und der ED-Werte der beiden Interaktionsregionen (siehe Figur 2b). Hierbei werden die ED-Werte für alle möglichen Regionen sowohl in der sRNA als auch in der mRNA vorberechnet, wobei für die mRNA die lokale Faltungsvariante RNAplfold<sup>5,7</sup> verwendet werden sollte, da eine mRNA keine globale Struktur ausbildet. Die Berechnung der modifizierten Duplexenergien wie in RNAup benötigt einen quadratischen Zusatzaufwand im Vergleich zu den einfacheren Ansätzen wie RNAhybrid, was ein genomweites Screening erschwert. IntaRNA vermeidet diesen Zusatzaufwand durch einen heuristischen Ansatz. Durch die Verwendung sogenannter Seeds wird jedoch die gleiche Vorhersagegenauigkeit erreicht.

RNAup und IntaRNA sind in der Lage, strukturell komplexe Interaktionen wie zum Beispiel „kissing hairpins“ vorherzusagen – häufig auftretende Strukturen, in denen eine Interaktion zwischen Haarnadelschleifen der sRNA und der mRNA ausgebildet wird. Jedoch sind die beiden Ansätze auf genau eine Interaktionsregion beschränkt. Bakterielle sRNA können indes auch Mehrfach-Interaktion wie etwa doppelte „kissing hairpins“ enthalten. Deren Bewertung wird von einer zweiten Klasse von Ansätzen gelöst, in denen komplette kombinierte Strukturen von sRNA und mRNA vorhergesagt und bewertet werden. Die ersten Verfahren hierzu, wie pairfold<sup>3</sup>, RNAcofold<sup>6</sup> und die Nupack-Methode<sup>11</sup> sind sogenannte Konkatenationsansätze. Hierbei werden die beiden RNA-Sequenzen unter Verwendung eines speziellen Linkersymbols miteinander verbunden. Danach wird eine Variante der üblichen RNA-Faltungsvorhersage (wie in Mfold<sup>27</sup> und RNAfold<sup>14</sup>) angewandt, um die

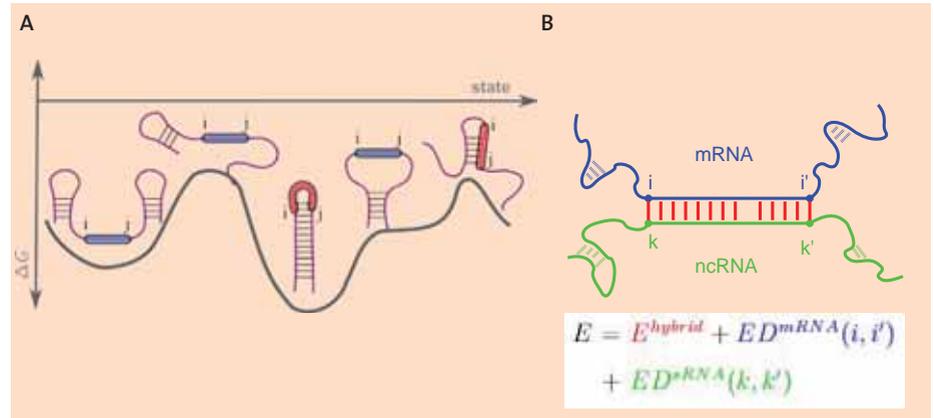


Abb. 2: A. Zugänglichkeit. Mögliche Interaktionsregion sind durch blaue Ovale markiert. B. Kombinierte Energie eines Duplex. (aus Backofen & Hess: RNA Biology 7(1), 2010)

gemeinsame Struktur vorherzusagen. Hierbei werden die Loops, die das Linkersymbol enthalten, speziell behandelt, um die korrekte Energie für die gemeinsamen Strukturen zu erhalten. Der Vorteil der Konkatenationsansätze ist ihre geringe Berechnungskomplexität sowie die Tatsache, dass bekannte Verfahren wie die Berechnung der Partitionsfunktion sowie der Basenpaarwahrscheinlichkeiten<sup>19</sup> übertragen werden können. Des Weiteren lassen sich mit Hilfe der Partitionsfunktion auch quantitative Parameter wie die Schmelztemperatur bestimmen. Nachteil der Konkatenationsansätze ist, dass sie nur gemeinsame genestete Strukturen betrachten (siehe Abb. 1b). Damit können zum Beispiel keine „kissing hairpins“ behandelt werden.

Daher sind in jüngster Zeit Ansätze entwickelt worden, die auch nicht-genestete gemeinsame Strukturen berechnen und somit komplexere Interaktionen (wie zum Beispiel die „double kissing hairpins“ von OxyS-fhlA<sup>4</sup>) vorhersagen können. Allerdings ist die Komplexität dieser Verfahren sehr hoch. Das allgemeine Problem ist sogar NP-vollständig (unter der Annahme, dass die Klasse P und NP verschieden sind, was im Allgemeinen akzeptiert, jedoch bisher unbewiesen ist). Dies bedeutet, dass in der Praxis jeder exakte Algorithmus exponentiell viel Zeit benötigt. Jedoch konnten eingeschränkte Klassen, die eine sogenannte Zick-Zack-Struktur verschiedener interagierender Hairpins verbieten, in polynomialer Zeit gelöst werden. Einer der ersten Ansätze hierbei wurde im IRIS-Tool vorgestellt<sup>21</sup>, wobei hier noch als Bewertungsfunktion die maximale Anzahl von Basenpaaren verwendet wurde. Alkan et al.<sup>1</sup> haben dieses Modell dann auf eine realistischere Energiefunktion erweitert.

Beide Ansätze sagen jedoch eine Struktur mit minimaler freier Energie (MFE) vorher. Jedoch ist bereits von der Strukturvorhersage für einzelne RNAs her bekannt, dass die MFE-Struktur häufig falsch ist. Der Standardansatz hierbei ist, die Partitionsfunktion zu berechnen. Dies wurde erstmalig in [10] und unabhängig davon in [15] gelöst, wobei hiermit nun quantitative Werte wie zum Beispiel die Schmelztemperatur berechnet

werden konnten. In [16] wurden dann mit diesem Ansatz Wahrscheinlichkeiten für Hybride definiert und berechnet. Allen diesen Verfahren ist eine hohe Berechnungskomplexität gemein, so dass sie bisher nicht für genomweite Screens eingesetzt werden können. Es sind jedoch in [9, 23, 24] erste Schritte unternommen worden, um die Komplexität zu reduzieren.

### Literatur

- [1] Alkan C, et al. J Computational Biology, 13:267, 2006.
- [2] Altschul SF, et al. Journal of Molecular Biology, 215:403, 1990.
- [3] Andronescu M, et al. J Mol Biol, 345:987, 2005.
- [4] Argaman L et al. Journal of Molecular Biology, 300:1101, 2000.
- [5] Bernhart SH, et al. Bioinformatics, 22:614, 2006.
- [6] Bernhart SH, et al. Algorithms Mol Biol, 1:3, 2006.
- [7] Bompfnewer AF, et al. Journal of Mathematical Biology, 56:129, 2008.
- [8] Busch A, et al. Bioinformatics, 24:2849, 2008.
- [9] Chitsaz H, et al. In S Salzberg and T Warnow, editors, Proc. of the 9th Workshop on Algorithms in Bioinformatics (WABI), vol. 5724 of Lecture Notes in Computer Science, pages 25-36. 2009.
- [10] Chitsaz H, et al. Bioinformatics, 25:i365, 2009.
- [11] Dirks RM, et al. SIAM Review, 49:65, 2007.
- [12] Gerlach W et al. Bioinformatics, 22:762, 2006.
- [13] Gruber AR, et al. Nucleic Acids Research, 36:W70, 2008.
- [14] Hofacker IL, et al. Monatshefte Chemie, 125:167, 1994.
- [15] Huang FW, et al. Bioinformatics, 2009.
- [16] Huang FWD, et al. Bioinformatics, 26:175, 2010.
- [17] Karlin S et al. Proc Natl Acad Sci USA, 87:2264, 1990.
- [18] Mathews D, et al. J Mol Biol, 288:911, 1999.
- [19] McCaskill JS. Biopolymers, 29:1105, 1990.
- [20] Muckstein U, et al. Bioinformatics, 22:1177, 2006.
- [21] Pervouchine DD. Genome Inform, 15:92, 2004.
- [22] Rehmsmeier M, et al. RNA, 10:1507, 2004.
- [23] Salari R, et al. In S Salzberg and T Warnow, editors, Proc. of the 9th Workshop on Algorithms in Bioinformatics (WABI), vol. 5724 of Lecture Notes in Computer Science, p 261-272. 2009.
- [24] Salari R, et al. In Proc. of RECOMB 2010. 2010. Accepted.
- [25] Tafer H et al. Bioinformatics, 24:2657, 2008.
- [26] Tjaden B, et al. Nucleic Acids Research, 34:2791, 2006.
- [27] Zuker M. Methods in Molecular Biology, 25:267, 1994.

### Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Rolf Backofen  
 Lehrstuhl für Bioinformatik  
 Institut für Informatik  
 Albert-Ludwigs-Universität Freiburg  
 Georges-Köhler-Allee 106, 79110 Freiburg  
 Tel./Fax: +49-761-203-7461 / -7462  
 backofen@informatik.uni-freiburg.de

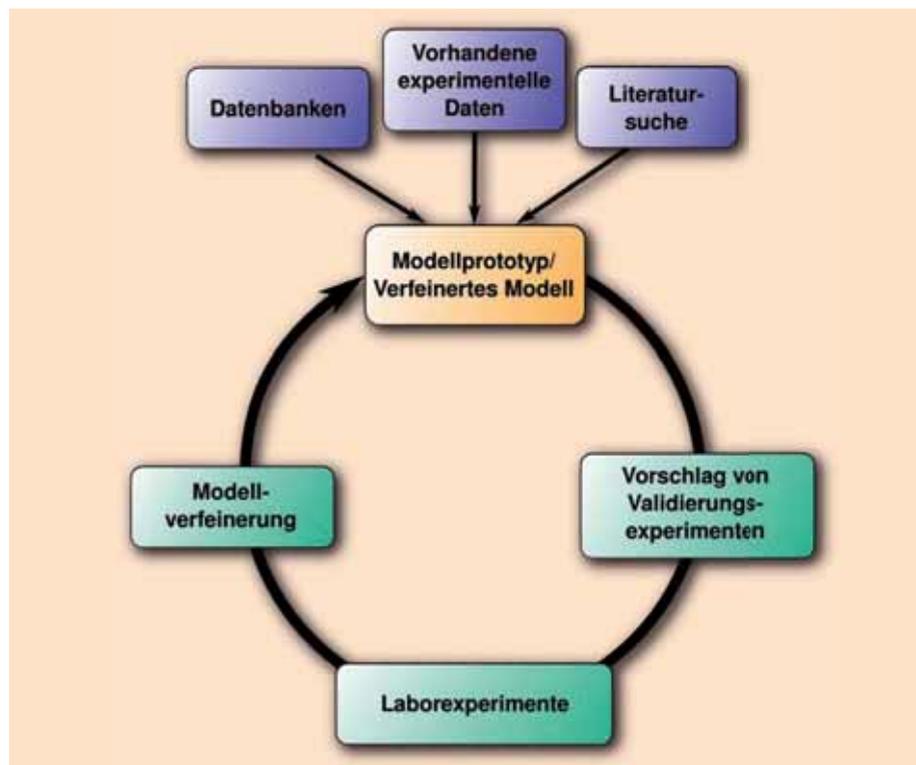
# Computerprogramme zur Modellierung genregulatorischer Netzwerke

Dr. Hendrik Hache, Dr. Christoph Wierling,  
Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Systembiologie-Gruppe, Berlin

Die computergestützte Modellierung biologischer Systeme erweist sich als sehr hilfreich und trägt zum Verständnis dieser komplexen Systeme bei. Im Rahmen der Systembiologie wurde bereits eine Vielzahl von Computerprogrammen entwickelt, um biochemische Prozesse zu modellieren, simulieren und analysieren. Sie helfen bei der Übersetzung biologischen Wissens in Modelle und bei der Untersuchung dieser Modelle im Computer. Dies wird unterstützt durch ein breites Spektrum von Simulations- und Analysefunktionen. In diesem Beitrag werden Computerprogramme vorgestellt, die sich als hilfreich bei der Modellierung kleiner als auch großer biochemischer und genregulatorischer Reaktionsnetzwerke erwiesen haben.

Die computergestützte Erstellung und Untersuchung von Modellen biologischer Systeme ist ein wesentlicher Bestandteil der Systembiologie<sup>1,2</sup>. Dabei werden Methoden und Techniken unterschiedlicher Wissenschaftsdisziplinen angewandt, um komplexe Interaktionen in biologischen Systemen systematisch zu untersuchen

sowie qualitative und quantitative Vorhersagen zu treffen. Modelle werden entwickelt, um das Verhalten von Systemen – zum Beispiel eines isolierten Signalwegs, einer Zelle oder eines ganzen Organismus – *in silico* unter genau definierten Bedingungen zu untersuchen. Auf Grundlage dieser Modelle können Experimente vorgeschla-



**Abb 1:** Modellierungsstrategie. Ein Modellprototyp kann aus Informationen aus Datenbanken, Literatur und experimentellen Daten erstellt werden. Auf Grundlage dieses Modells und von *in silico*-Experimenten können geeignete Validierungsexperimente vorgeschlagen und diese im Labor durchgeführt werden. Die neu gewonnenen Erkenntnisse aus den zusätzlichen experimentellen Daten können zu einer Verfeinerung des Modells führen. Die Auswertung der zusätzlichen Daten führen zu einer Verfeinerung des Modells. Dieser Zyklus kann mehrmals durchlaufen werden.

gen werden, die im Labor *in vivo* oder *in vitro* durchgeführt und deren Ergebnisse mit den Vorhersagen der Modelle verglichen werden. Diese Validierungen führen zu einer Verfeinerung der Modelle und zu einem besseren Verständnis der biologischen Systeme (Abb. 1).

Von besonderem Interesse ist die Regulation der Genexpression, da diese die Grundlage vieler zellulärer Prozesse ist. Allerdings erweisen sich die Regulationsmechanismen als sehr komplex, was sich in Gestalt genregulatorischer Netzwerke widerspiegelt. Die Genexpression wird in der Zelle vielschichtig reguliert, nicht nur auf Transkriptionsebene, sondern etwa auch mittels chemischer und struktureller Veränderung der DNA, Steuerung des Transportes und Abbaus der Transkripte und Proteine, durch alternatives Slicing und durch regulatorische microRNAs. Ein besseres Verständnis der Regulationsmechanismen kann am besten durch systembiologische Untersuchungen gewonnen werden.

## Anforderungen an Computerprogramme

Die computergestützte Modellierung und Simulation biologischer Systeme im Computer wird erst durch den Einsatz passender Softwarepakete effektiv. Eine eigene Implementierung einer Modellierungsumgebung ermöglicht eine optimale Anpassung an die Problemstellung. Allerdings ist dieser zusätzliche Aufwand oft nicht nötig, da bereits diverse Programme für die kinetische Modellierung entwickelt wurden. Für die mathematische Beschreibung biochemischer Reaktionssysteme wurde das Format „Systems Biology Markup Language“ (SBML) entwickelt. Mit diesem speziellen XML-Format ist der Austausch von Modellen zwischen verschiedenen Programmen möglich<sup>3</sup>.

Biologische Modelle bestehen aus einer Vielzahl unterschiedlicher Komponenten, die ihre jeweiligen Gegenstücke in der Natur repräsentieren, zum Beispiel DNA, Gene, mRNA, miRNA, Proteine, Metabolite, Enzyme etc. Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten Interaktionen zwischen diesen Komponenten zu beschreiben<sup>4</sup>. Sehr verbreitet ist die Beschreibung mit Hilfe gewöhnlicher Differentialgleichungen. Diese wird von den meisten Computerprogrammen unterstützt. Eine abstraktere Beschreibung ist mit Hilfe logischer Verknüpfungen möglich, wie Boolean-Netzwerke oder Petri-Netze. Diese Modellierungsarten bieten sich an, wenn nur diskrete und qualitative Daten für die Modellierung zur Verfügung stehen. Im Gegensatz dazu ist die Simulation einzelner Moleküle mit stochastischen Verfahren möglich, allerdings auch sehr aufwendig. Generell gilt, je genauer die Natur im Computermodell abgebildet werden soll, desto mehr Parameter müssen eingeführt werden, die in vielen Fällen experimentell noch nicht bestimmt wurden und daher abgeschätzt werden müssen.

Modellierungssysteme unterstützen den Nutzer mit vielfältigen Funktionen bei der

**Tab. 1:** Übersicht über einige Softwareanwendung für die Modellierung, Simulation und Analyse von biochemischen und genregulatorischen Reaktionsnetzwerken.

Name	Simulatoren	Analyseverfahren	URL
CellDesigner	DGL	Sensitivitätsanalyse	<a href="http://www.celldesigner.org">http://www.celldesigner.org</a>
COPASI	DGL stochastisch	Bestimmung stationärer Zustände, Stabilitätsanalyse, Sensitivitätsanalyse, Parameterschätzung und Optimierung	<a href="http://www.copasi.org">http://www.copasi.org</a>
PyBioS	DGL	Bestimmung stationärer Zustände, Stabilitätsanalyse, Sensitivitätsanalyse	<a href="http://pybios.molgen.mpg.de">http://pybios.molgen.mpg.de</a>
SynBioSS	stochastisch		<a href="http://synbio.ss.sourceforge.net">http://synbio.ss.sourceforge.net</a>
GeNGe	DGL	Bestimmung topologischer Charakteristika	<a href="http://genge.molgen.mpg.de">http://genge.molgen.mpg.de</a>

Modellerstellung, Simulation und Analyse. Es können „stand-alone“- und „Web-basierte“ Programme unterschieden werden. Ein stand-alone-Programm plus Zusatzpakete muss lokal, abhängig vom Betriebssystem auf dem Computer installiert und verwaltet werden, auch Modellierung und Simulation erfolgen lokal. Dagegen benötigt ein Web-basiertes Programm oft nur einen funktionierenden Browser. Modelle werden zentral gespeichert und können so einer größeren Gemeinschaft zur Verfügung gestellt werden. Dieser Ansatz wird von einigen der hier aufgeführten Programme verfolgt. Das Erstellen komplexer Modelle wird von den Programmen meist entweder dialogorientiert oder diagrammatisch unterstützt. Das erleichtert die Modellerstellung und verhindert Eingabefehler. Desweiteren hilft die Visualisierung des Reaktionsnetzwerks logische Fehler schneller zu erkennen und fehlende Komponenten und Interaktionen einfach zu ergänzen. Im folgenden werden einige Softwarepakete vorgestellt, die sich als sehr hilfreich bei der Modellierung, Simulation und Analyse biochemischer und genregulatorischer Reaktionsnetzwerke erwiesen haben.

### Softwareanwendungen

CellDesigner ist ein Modellierungs- und Simulationsprogramm, mit dem intuitiv diagrammatische komplexe genregulatorische und biochemische Reaktionsnetzwerke gezeichnet und so in Computermodelle umgesetzt werden können. Die graphischen Elemente biologischer Entitäten, wie etwa Gene, Proteine, Metabolite, Rezeptoren etc. und Reaktionstypen, wie Transkription, Translation, Transport, Katalyse, Regulation, Abbau, Phosphorylierung etc. folgen der Darstellungsweise der „Systems Biology Graphical Notation“ (SBGN). Dadurch ist eine standardisierte graphische Abbildung von Reaktionsnetzwerken möglich. Der CellDesigner bietet einen integrierten Simulator an, mit dem die zeitlichen Konzentrationsänderungen aller Komponenten auf Basis eines automatisch erstellten Differentialgleichungssystems berechnet werden können. Die im CellDesigner erstellten Modelle können

als SBML exportiert und in andere Programme importiert werden.

Eine weitere Softwareanwendung für die Simulation und Analyse biochemischer Netzwerke ist COPASI. Im Gegensatz zu CellDesigner wird in COPASI die Modellerstellung nicht grafisch unterstützt, sondern erfolgt durch sukzessives Hinzufügen von Reaktionen in das Modell oder durch SBML-Import. Der Schwerpunkt des Programms liegt auf der Analyse des dynamischen Verhaltens des Modellsystems durch die Identifizierung stationärer Zustände und Untersuchung deren Stabilität, der Sensitivitätsanalyse (z.B. metabolische Kontrollanalyse, MCA) sowie der Parameteroptimierung und -schätzung auf Grundlage von Daten. COPASI bietet die besondere Möglichkeit, das System mit gewöhnlichen sowie stochastischen Differentialgleichungen zu simulieren.

PyBioS dagegen ist eine Web-basierte Anwendung zur Simulation und Analyse biochemischer Reaktionsnetzwerke. Modelle können, wie bei den anderen Programmen auch, sukzessiv aus einzelnen Reaktionen zusammengestellt werden. Zusätzlich bietet PyBioS die Möglichkeit, einzelne Reaktionen oder ganze Pathways aus Reaktionsdatenbanken wie KEGG und Reactome automatisch zu importieren. Dadurch können sehr leicht große Reaktionsnetzwerke erstellt und verändert werden. Da insbesondere bei großen Netzwerken die Darstellung unübersichtlich wird, unterstützt PyBioS eine selektive Übersicht von Teilen des gesamten Netzwerks. Nachdem die Netzwerkstruktur erstellt und die Kinetiken definiert wurden, konstruiert PyBioS ein Differentialgleichungssystem, welches numerisch gelöst wird, um das zeitabhängige Verhalten im Kontext des grafischen Netzwerks darzustellen. Zusätzliche Analysemethoden, wie etwa die Identifizierung stationärer Zustände und Sensitivitätsuntersuchung ermöglichen die genaue Untersuchung des Systems. Auch PyBioS unterstützt den Import und Export von Modellen im SBML-Format.

Die Synthetic Biology Software Suite (SynBioSS) ist ein kürzlich entwickeltes Programmpaket für die Modellierung und stochastischen Simulation von synthetischen biologischen Netzwerken. SynBioSS unterstützt den Benutzer bei dem Design von biomolekularen Interaktionen auf DNA-

Ebene. Modelle können mit Hilfe eines Desktop Simulators oder eines Web-basierten Designers erstellt werden. Im Designer können genetische Konstrukte aus BioBricks zusammengesetzt werden – das sind kleine DNA-Konstrukte mit genau definierten Funktionen. Das Programm verfolgt also den Ansatz der synthetischen Biologie. Passende Kinetiken und Parameter können aus einer Wiki-Datenbank den Reaktionen zugewiesen werden. Auf Grundlage eines so erstellten Modells können diskrete oder kontinuierliche stochastische Simulationen durchgeführt werden. SynBioSS bietet die Möglichkeit des Imports und Exports von Modellen im SBML-Format.

Einen etwas anderen Ansatz bei der Modellierung verfolgt der Gene Network Generator (GeNGe). Diese Web-basierte Anwendung konzentriert sich auf die Modellierung, Simulation und Analyse genregulatorischer Netzwerke. Sukzessiv kann dialogorientiert eine beliebige Anzahl von Netzwerkstrukturen rein zufällig oder mit Randbedingungen erzeugt werden. Es wird ein Differentialgleichungssystem erstellt, in dem die Transkription der Gene durch spezielle nicht-lineare Funktionen beschrieben wird. Die Modelle können im SBML-Format exportiert werden und stehen so anderen Programmen für weitere Analysen zur Verfügung. GeNGe unterstützt einerseits die Erzeugung von Benchmarkdatensätzen für Rekonstruktionsalgorithmen und ermöglicht andererseits Untersuchungen der Netzwerkstruktur durch Simulationen spezifischer und unspezifischer Störungen des Systems.

Die oben aufgeführten Programme zeigen nur einen kleinen Ausschnitt von Softwarepaketen, die für die Modellierung, Simulation und Analyse von biochemischen und genregulatorischen Prozessen entwickelt wurden<sup>5,6</sup>. Eine Übersicht von SBML-konformen Programmen wird von der SBML-Gemeinschaft verwaltet<sup>7</sup>. Eine Anpassung der Programme an neue Herausforderungen, zum Beispiel die Integration von heterogenen Daten und die Entwicklung weiterer Analysemethoden ist in den folgenden Jahren zu erwarten.

### Literatur

- [1] E. Klipp et al., *Systems Biology – A Textbook*, Wiley-VCH (2009).
- [2] B.D. Ventura et al., *Nature* 443, 527 (2006).
- [3] C. Wierling, R. Herwig, H. Lehrach, *Brief Funct Genomic Proteomic* 6, 240 (2007).
- [4] G. Karlebach, R. Shamir, *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 770 (2008).
- [5] R. Alves, F. Antunes, A. Salvador, *Nat Biotechnol* 24, 667 (2006).
- [6] E. Klipp et al., *Nat Biotechnol* 25, 390 (2007).
- [7] [http://sbml.org/SBML\\_Software\\_Guide](http://sbml.org/SBML_Software_Guide).

### Korrespondenzadresse

Dr. Hendrik Hache  
 Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik  
 Systembiologie-Gruppe  
 Ihnestr. 63-73, 14195 Berlin  
 Tel.: +49-(0)30-8413-1269  
 hache@molgen.mpg.de

# microRNA-Profile als Diagnosemethode

Dr. Andreas Keller<sup>1,5</sup>, Prof. Dr. Hans-Peter Lenhof<sup>2</sup>, Dr. Ioannis Amarantos<sup>5</sup>, Dr. Andrea Bauer<sup>3</sup>, Nathalia Giese<sup>6</sup>, Dr. Jörg Hoheisel<sup>3</sup>, Dr. Petra Leidinger<sup>4</sup>, Professor Dr. Eckart Meese<sup>4</sup>, <sup>1</sup>Biomarker Discovery Center Heidelberg; <sup>2</sup>Zentrum für Bioinformatik, Universität Saarbrücken; <sup>3</sup>Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg; <sup>4</sup>Arbeitsgruppe für Humangenetik, Univ. Saarbrücken; <sup>5</sup>febit group; <sup>6</sup>Department of Surgery, Medical University, Heidelberg

**Für eine Vielzahl an Erkrankungen gibt es trotz intensiver Forschung einen großen Bedarf an einer frühzeitigen, nicht-invasiven Diagnostik mit hoher Spezifität und Sensitivität. Biomarker, die dies versprechen, stammen aus der Gruppe der kleinen, nicht-kodierenden Nukleinsäuren: die microRNAs (miRNAs). Für eine große Zahl von Erkrankungen wurden bereits differenziell regulierte microRNAs identifiziert. Als Grundlage für diese Analysen diente vor allem Biopsiematerial erkrankten Gewebes. Zunehmend werden microRNAs aber auch in Körperflüssigkeiten detektiert, wie Blut, Serum oder Urin. Andere Forschungsgruppen und unser Team konnten nachweisen, dass in diesen peripheren Profilen ein großes diagnostisches Potential steckt. Entscheidend für unseren Ansatz ist, dass anstatt einzelner miRNAs eine Gruppe von miRNAs gemessen und komplexe, aussagekräftige Profile erstellt werden.**

Trotz erheblicher wissenschaftlicher Anstrengungen wurden für eine Vielzahl von Erkrankungen bis heute keine hochspezifischen diagnostischen Biomarker gefunden. Dank neuartiger Hochdurchsatz-Technologien können neue Arten von Biomarkern – vor allem auf Genom- und Transkriptom-Ebene – gemessen werden, die sowohl für eine frühzeitige Diagnose als auch die Prognose und die Stratifizierung von Risikogruppen relevant sind.

Eine besonders vielversprechende Klasse von Markern, die zunehmend an Bedeutung in der biomedizinischen Forschung gewinnt, sind kleine nicht-proteinkodierende RNAs, sogenannte microRNAs (miRNAs). Sie spielen eine entscheidende Rolle in der Genregulation, indem sie sequenzspezifisch an ihre Ziel-mRNAs (messenger RNA) binden und eine Translationsrepression<sup>1</sup> oder die mRNA-

Degradation bewirken. Bereits Anfang der neunziger Jahre erschienen die ersten Arbeiten über miRNAs. Bis heute sind allein für den Menschen fast 1.000 dieser Moleküle bekannt und in der miRBase<sup>2</sup> erfasst – einer der gängigsten Datenbanken für miRNAs.

Frühe Studien beschäftigten sich hauptsächlich mit Gewebeprofilen von miRNAs. Es wurde gezeigt, dass miRNA-Expressionsprofile nicht nur hochspezifisch für Gewebe und Entwicklungsstadien sind, sondern auch die molekulare Klassifikation von Tumoren gestatten<sup>3</sup>. In der jüngeren Vergangenheit ist ein zunehmender Trend hin zu Hochdurchsatz-Messungen zu verzeichnen. Dies gilt sowohl für miRNA-Profile, die aus Biopsiematerial ermittelt wurden, als auch für die zuvor erwähnten „peripheren Profile“, die mittels Blut-, Serum-, oder Urinproben bestimmt werden. Die bemerkenswerte Se-

rumstabilität der miRNAs erhöht ihr Potential als Blut-basierte Biomarker<sup>4</sup>. Ein CE-zertifizierter Test, der auf miRNA-Profilen beruht, könnte somit in Standard-Blutuntersuchung integriert werden.

Zur Erfassung von miRNA-Profilen bieten sich grundsätzlich verschiedene Methoden an, wie etwa die quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR), das „Next Generation Sequencing“ und das „targeted Next Generation Sequencing“, von denen die beiden letzteren auch zur Detektion somatischer Mutationen von miRNAs geeignet sind. Zusätzlich sind Microarray-basierte Ansätze geeignet, die kostengünstiger sind als die neuen Sequenzieretechniken. Wir haben das Screening von microRNAs mit Hilfe einer vollständig automatisierten Microarray-Plattform durchgeführt, dem Geniom<sup>®</sup> Real-Time Analyzer (febit biomed GmbH, Heidelberg), und die Ergebnisse mittels qRT-PCR (TaqMan<sup>®</sup>, Applied Biosystems) validiert. Dabei erwiesen sich die vergleichsweise geringen Kosten der verwendeten Microarray-Methode, die hohe Reproduzierbarkeit der Daten und ihr hoher Durchsatz als vorteilhaft. Pro Tag können auf einem Geniom Real-Time Analyzer acht Profile für etwa 1.000 miRNAs in sieben Replikaten gemessen werden.

Das Ziel unserer Studie war es, durch die Messung einer größeren Anzahl an Blutprofilen von Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen sowie von nichterkrankten Kontrollpersonen unter standardisierten Bedingungen zu testen, wie spezifisch die jeweiligen miRNA-Profile eine Erkrankung anzeigen. Entscheidend für eine sichere und diagnostisch aussagekräftige Unterscheidung zwischen Erkrankten und Gesunden ist es, Gruppen von miRNAs zu untersuchen, die ein miRNA-Expressionsmuster ergeben. Denn im Gegensatz zu einzelnen miRNAs erreichen die miRNA-Signaturen die für einen für diagnostischen Assays erforderliche Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit<sup>5,6</sup>.

Anhand einer Krebsart, dem Lungenkarzinom<sup>5</sup>, und einer Autoimmunerkrankung, der Multiplen Sklerose<sup>6</sup>, haben wir zunächst Machbarkeitsstudien mit Probenmaterial von jeweils rund 20 Erkrankten und Gesunden durchgeführt.

## Resultate

Für beide Erkrankungen haben wir unter Verwendung sogenannter „Feature Selection“-Methoden und -Klassifikatoren (Support Vector Machines(SVM) aussagekräftige Resultate erzielt. Für die Klassifikation von Lungenkrebspatienten wurden 24 miRNAs für eine spezifische miRNA-Biomarker-Signatur selektiert. Mit dieser miRNA-Signatur wurde eine Patientenklassifikation mit einer Genauigkeit von 95,4%, einer Spezifität von 98,1%, und einer Sensitivität von 92,5% erreicht. Für sechs ausgewählte miRNAs wurde die mittels

## Laborwelt Hintergrund

### Biomarker Discovery Center Heidelberg

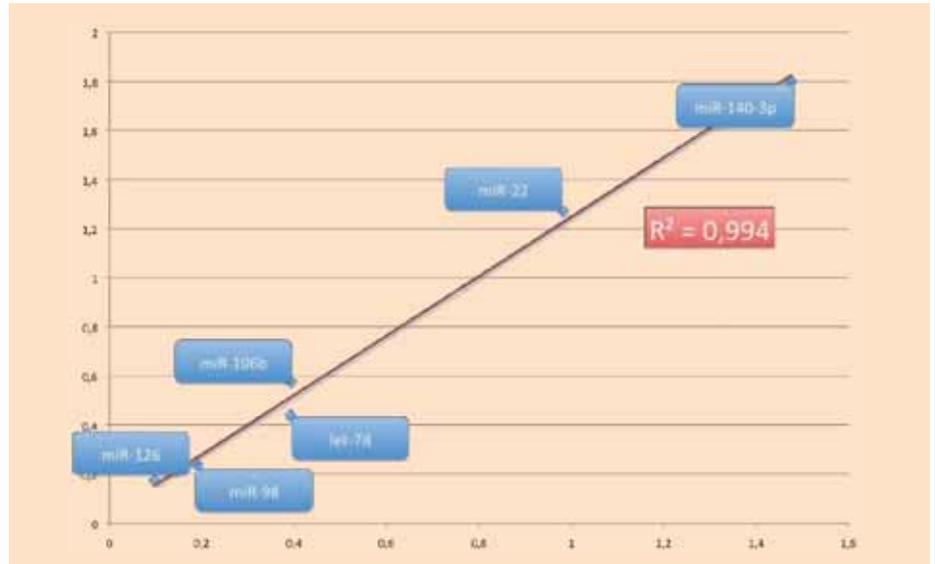
Das Biomarker Discovery Center (BDC) Heidelberg ist Teil des Biotechnologie-Spitzenclusters Rhein-Neckar (BioRN). In einem der vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projekte arbeitet das BDC Heidelberg an neuen Lösungen zur Identifikation und Validierung von Biomarkern. Dazu nutzt das BDC innovative Technologien aus dem Bereich der Hochdurchsatz-Sequenzierung sowie Microarrays. In einem weiteren Projekt beschäftigen sich die Wissenschaft BDC mit der Entwicklung und Validierung neuartiger miRNA-basierter Signatur-Arrays für Tumore.



der Microarray-Analyse nachgewiesene differentielle Expression durch qRT-PCR validiert. Dabei zeigte sich mit einem  $R^2$ -Wert von 0,994 eine sehr hohe Reproduzierbarkeit der miRNA-Expressionsdaten (Abb. 1).

Für Multiple Sklerose ließ sich mit einem Satz von 48 miRNAs eine Klassifikation der Patienten mit einer Genauigkeit von 96,3%, einer Spezifität von 95% und einer Sensitivität von 97,6% gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe erreichen (Abb. 2). Beide Machbarkeitsstudien belegen eindrucksvoll den Mehrwert komplexer miRNA-Biomarker-Profile gegenüber einzelnen miRNA-Biomarkern.

Aufgrund der für Lungenkarzinome und Multiple Sklerose erhaltenen vielversprechenden Ergebnisse haben wir zunächst begonnen, miRNA-Expressionsprofile für eine große Anzahl von Krebsarten und andere Erkrankungen zu erfassen, bevor Untersuchungen mit größeren Probandenkollektiven durchgeführt werden – darunter Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Pankreatitis, Sarkoidose, COPD, Melanome, Prostata- und Pankreaskrebs. Bei allen werden miRNA-Expressionsmuster in Blut erfasst. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich für viele paarweise Vergleiche auch zwischen verschiedenen Erkrankungen sehr gute Klassifikationsergebnisse erzielen lassen. Einige Szenarien zeigten aber auch mögliche Limitationen der Methode. So ließen sich die Entitäten Pankreatitis und Pankreaskrebs nur mit unzureichender Genauigkeit trennen. Erst die Untersuchung von Biopsiematerial ließ Rückschlüsse auf die jeweilige Erkrankung des Pankreas bei den einzelnen Patienten zu. Durch eine gemeinsame Auswertung aller gemessenen Erkrankungen hoffen wir, zum ersten Mal eine Aussage treffen zu können,



**Abb 1:** Validierung der Microarray-Resultate mittels qRT-PCR. Für ausgewählte, deregulierte miRNAs wurde eine Validierung mit einer zweiten experimentellen Plattform durchgeführt. Die x- und y-Achse zeigen die Veränderung auf einer logarithmischen Skala für Microarray und qRT-PCR. Die Messungen wiesen eine ausgezeichnete Korrelation auf; der  $R^2$ -Wert lag bei 0,994.

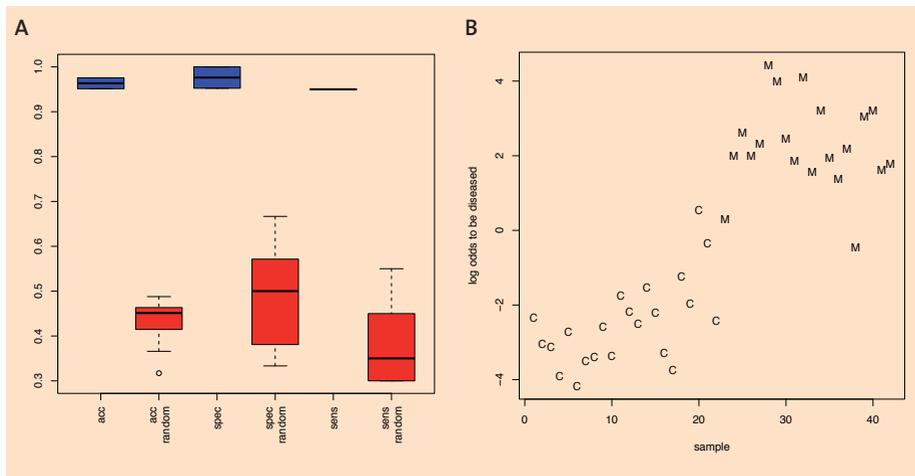
wie spezifisch die jeweiligen miRNA-Profile sind (Manuskript in Vorbereitung).

**Ausblick**

Das Potential von miRNAs als diagnostische Marker wird durch eine zunehmende Zahl an Pilotstudien untermauert. Weitere Forschungen werden zeigen, in welchem Umfang die Erfassung von miRNA-Expressionsprofilen in Blut und anderen Körperflüssigkeiten für klinische Diagnosen geeignet sind und als

Grundlage einer nicht-invasiven Diagnostik dienen können.

Darüber hinaus bergen miRNA-Profile die Möglichkeit, als prognostische Marker zu dienen und bei einzelnen Patienten bei der Vorhersage der Wirksamkeit medikamentöser Behandlungen zu helfen. Nach Zulassung entsprechend valider diagnostischer Tests könnten miRNA-Profile einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung einer „personalisierten Medizin“ leisten, die unter anderem darauf abzielt, auf Basis der individuellen genetischen Ausstattung eine Therapieoptimierung für den einzelnen Patienten zu erreichen. Hochdurchsatz-Analysen von miRNA-Profilen aus Gewebe, FFPE (Formalin-fixed, Paraffin-embedded)-Proben unterschiedlicher Zelltypen sowie aus Körperflüssigkeiten, wie Blut, Serum oder Urin, werden zunehmend an Bedeutung gewinnen und zu einer verbesserten Diagnostik sowie zu einem vertieften biologischen Verständnis einer Vielzahl von Erkrankungen beitragen.



**Abb 2:** A: Boxplot der Klassifizierungsergebnisse. Die blauen Kästchen zeigen die Klassifizierungs-Genauigkeit, -Spezifität sowie -Sensitivität an, basierend auf einem diagnostischen Set von 48 miRNAs. Die roten Boxen zeigen vergleichsweise zufällige Klassifikationsresultate basierend auf demselben Datensatz. B: Der Logarithmus des Quotienten aus der Wahrscheinlichkeit eine MS-Patientenprobe zu sein und eine gesunde Kontrollprobe zu sein, wird für jede Kontrollprobe (C) und für jede MS-Probe (M) auf der y-Achse gezeigt. Ist dieser Quotient größer als Eins, der Logarithmus entsprechend größer als Null, ist es wahrscheinlicher, dass es sich bei der getesteten Probe um einen MS-Patienten handelt.

**Literatur**

- [1] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Science. 2001 853-8.
- [2] Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. Nucleic Acids Res. 2006 D140-4.
- [3] Croce CM, Calin GA. Cell. 2005; 122:6-7.
- [4] Mitchell PS et al. PNAS 2008 10513-10518
- [5] Keller A et al. BMC Cancer. 2009; 9:353.
- [6] Keller A et al. PLoS One. 2009 e7440.

**Korrespondenzadresse**

Dr. Andreas Keller  
febit group, Heidelberg  
andreas.keller@febit.de

# Abwehr biologischer Gefahren – Medical Biodefense Conference

Thomas Gabrielczyk, Redaktion LABORWELT

Neue Impfstoffe und Behandlungsstrategien gegen als Biowaffen nutzbare Erreger und Toxine, deren Identifikation, Typisierung, Detektion sowie Ausbruchsszenarien und neue Herausforderungen für die Forschung standen im Fokus der 12. Medical Biodefense Conference Ende Oktober in München (20. bis 22.10.2009). Über leere Säle konnte sich der Konferenzvorsitzende, Oberstarzt Prof. Dr. Lothar Zöllner, nicht beklagen, dessen Institut für Mikrobiologie an der Sanitätsakademie der Bundeswehr der Wissenschaftsrat bereits 2006 herausragende Leistungen bescheinigt hatte. Mehr als 300 Experten der militärischen Sanitätsdienste und ihrer zivilen Forschungspartner aus 30 Ländern waren in die Ernst-von-Bergmann-Kaserne im Nordwesten Münchens geströmt, um sich über die neuesten Entwicklungen in der Abwehr von Biowaffen zu informieren. Neben rund 90 Vorträgen und 70 Postern zu zehn Konferenzthemen geschah dies erstmals mittels einer Firmenausstellung, in der Anbieter von Analysen- und Detektionstechnik, wie MWG Eurofins, Eppendorf, TIB Molbiol oder Senova, aber auch Vakzine-Anbieter wie Novartis oder Intercell ihre Produkte präsentierten. Angestoßen hatten das Novum die Mitorganisatoren der Tagung von der Deutschen Gesellschaft für Wehrmedizin und -pharmazie, um Forscher und Unternehmen stärker ins Gespräch zu bringen und gemeinsame Produktentwicklungen anzuregen.

Die gefühlte Bedrohung durch Biowaffen hat sich gewandelt. „Mit 9/11 und den Anthrax-Briefen 2001 sind neben verdächtigen Staaten auch nicht-staatliche Akteure in das öffentliche Bewusstsein gerückt“, erläuterte Dr. Volker Beck, Biodefense-Berater des Bundesaußenministeriums, zum Auftakt der Tagung. Die Informationslage sei allerdings oft nicht sehr transparent und belastbar. So hätte sich im Nachhinein so manches Postulat

der neunziger Jahre über die 10 bis 15 damaligen „Schurkenstaaten“, denen die Fähigkeit zur Entwicklung von Biowaffen zugetraut wurde, als unrichtig erwiesen. Auch Gerüchte über die Biowaffenentwicklung durch terroristische nichtstaatliche Organisationen wie Al-Kaida oder dem Islamischen Dschihad rissen nicht ab. Auf der Tagung präsentierte Beck indes Übersetzungen von Ricin-Herstellungsprotokollen des Dschihad, die deutlich

belegen, dass die Terrorgruppe derzeit weder über das Know-how noch über entsprechende Kapazitäten verfügt, Biowaffen herzustellen und wirksam zu verteilen. Ähnliches gelte für Anthrax-Programme von Al-Kaida. Die Fähigkeit, Biowaffen zu entwickeln, liege demnach derzeit klar bei staatlich gestützten Programmen. Gleichwohl seien Bioverbrechen möglich, wie die Anthrax-Briefe von 2001 gezeigt hätten. Dies habe laut Beck die öffentliche Diskussion über den Missbrauch biologischer Agenzien aufleben lassen, insbesondere über die Veröffentlichung dafür kritischer Publikationen und neue Technologien mit Missbrauchspotential. Zugleich haben die USA ihr Budget für die zivile Biodefense-Forschung von 2001 bis heute auf 6 Mrd. US-\$ verzehnfacht. Wichtig sei es, dass in Feldern wie der Nanobiotechnologie und der Bionanotechnologie sowie der Synthetischen Biologie neben staatlichen Regelungen auch Forscher und Unternehmen aktiv daran mitwirkten, einen Missbrauch zu verhindern. Gerade die Synthetische Biologie habe seit der Rekonstruktion des Polioerregers 2002 kontinuierliche Fortschritte gemacht, sagte Beck am Rande der Tagung, und könne binnen der nächsten 20 Jahre biowaffentaugliches Material in neuer Qualität hervorbringen.

Aktuell spielen Bioverbrechen in Deutschland allerdings keine Rolle, erläuterte Bernfried Seiwert vom Bundeskriminalamt in Wiesbaden in seinem Vortrag. Pro Jahr würden dem Bundeskriminalamt weniger als 10 Fälle bekannt.

Allerdings führe Bioterrorismus bereits zu deutlichen Einschränkungen der Forschungsfreiheit und beim Zugang zu biologischen Materialien, erklärte Stef Sienstra vom 1-CI-MIC-Batalion der königlich-niederländischen Armee. Um strikten gesetzlichen Regelungen zuvorzukommen, die die Zusammenarbeit in den Life Sciences weiter einschränkten, seien deshalb Selbstverpflichtungsregelungen von Forschung und Industrie von großer Bedeutung.

## Prävention und Epidemiologie

Lebensmittel als potentielle Ziele von Angriffen mit Mikroorganismen oder Toxinen sind derzeit weit von einer systematischen globalen Überwachung entfernt. Derzeit dauere die Identifikation von Lebensmittelpathogenen zwischen zwei und sechs Wochen, erklärte Prof. Dr. Andreas Hensel vom Bundesinstitut für Risikobewertung (Berlin). Auf der Tagung stellte er ein BMBF-gefördertes Netzwerk aus 26 Partnern vor, das sich eine schnellere Notifikation sowie die Entwicklung von Hochdurchsatzsystemen zur Detektion gefährlicher biologischer und chemischer Agenzien entlang der Produktions- und Logistikwege zur Aufgabe gemacht hat. Erstmals soll auch auf der Basis zuvor ermittelter Daten ein Mo-

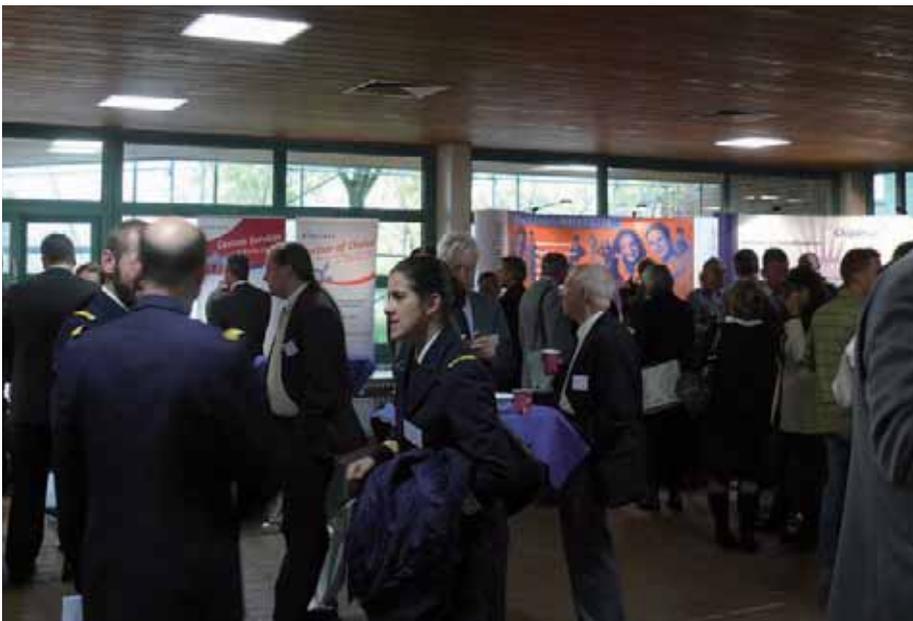


Abb 1: Internationales Publikum auf der Medical Biodefense Conference an der Sanitätsakademie der Bundeswehr in München

dell entwickelt werden, das voraussagt wie Pathogene auf verschiedenen Lebensmitteln wachsen. Die Daten wollen die Forscher in eine Datenbank einfließen lassen, die künftig Frühwarnungen bei entsprechenden Kontaminationen ermöglichen sollen.

### Neue Entwicklungen in der Impfstoffforschung

Zahlreiche Tagungsbeiträge an den zwei Konferenztagen drehten sich um die Erkennung, Rückverfolgung, Typisierung und Bekämpfung beziehungsweise Prävention gefährlicher Pathogene des sogenannten Dirty Dozens sowie entsprechender Toxine.

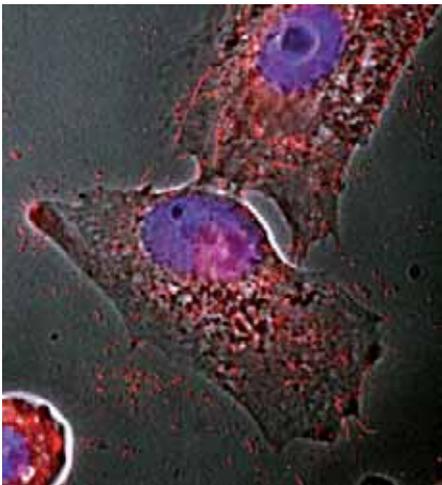


Abb. 2: Freisetzung filamentöser Ebolaviren (rot) aus Verozellen.

Breiten Raum nahm dabei die Vorstellung militärisch relevanter Impfstoffe ein – für zahlreiche biopharmazeutische Unternehmen ein wichtiger Geschäftszweig.

Neben bekannten Ansätzen, wie Baxters in Verozellen hergestellte pandemische Grippeimpfstoffe auf Basis inaktivierter Viruspartikel oder Intercells (Wien) im vergangenen Jahr zugelassene Vakzine gegen Japanische Enzephalitis (JE), wurden auch Impfstoffstrategien in früherem Entwicklungsstadium vorgestellt.

Remy Teyssou (Sanofi-Pasteur, Lyon) präsentierte Daten zu einer seit dem Jahr 2000 entwickelten Lebendvakzine auf Basis attenuierter Viren, die gegen die vier Serotypen des Denguefiebers schützen soll. Mit nach WHO-Schätzungen 230 Millionen Infizierten pro Jahr ist das Fieber nicht nur ein Problem von Truppen, die in den Tropen stationiert sind. Denn die meisten der 20.000 Opfer der hämorrhagischen Komplikation des Fiebers pro Jahr, für das bislang kein Tiermodell existiert, sind Kinder. In Phase I-Tests an insgesamt 318 Teilnehmern mit dem attenuierten Impfvirus, das die Envelope-Proteine und Replikationsgene exprimiert, beobachtete Sanofi eine Seroprotektionsrate von 63% bis

100% nach drei Impfungen. Seit Februar 2009 wird die Wirksamkeit des Impfstoffes an 4.000 Kindern in Thailand erprobt.

Auf großes Interesse stieß auch die Vorstellung der ersten in Primaten gegen hämorrhagische Arena- und Filoviren wirksamen Vakzine durch eine US-kanadische Gruppe um Ute Ströher. Eine Lebendvakzine gegen den Zaire-Subtypus des hämorrhagischen Ebolavirus, die Cymomolgus-Makaken 28 Tage vor Administration einer ansonsten tödlichen Virusdosis erhielten, schützte diese vollständig. Ihre Wirksamkeit hatte die Vakzine auf Basis des VSV-Virus, der wahlweise die Glykoproteine des Ebola- und Marburgvirus sowie des Erregers des Lassa-Fiebers exprimiert, bereits in Nagermodellen gezeigt. Auch mit Ebola infizierte Tiere schützte die Vakzine. Immerhin 50% der mit dem Filovirus infizierte Makaken überlebten die Injektion einer ansonsten tödlichen Virusdosis, sofern 20 bis 30 Minuten nach der Infektion geimpft wurde. Keiner der mit dem Marburgvirus infizierten Primaten entwickelte nach entsprechender Vakzinierung klinische Symptome. Dies eröffnete erstmals eine Behandlung von medizinischem Personal, das sich versehentlich infiziert hat oder von Betroffenen absichtlich herbeigeführter Krankheitsausbrüche.

Novartis Vaccines stellte in München Fortschritte bei der Entwicklung seiner SMIP (small molecule immune potentiators)-Plattform vor. SMIPs lassen sich als Adjuvantien sowie als immunmodulatorische Wirkstoffe gegen Biowaffen und immunologische Erkrankungen einsetzen. Die TLR (Toll-like Rezeptor)-Agonisten werden derzeit in Tiermodellen der biologischen Sicherheitsstufen 3 bzw. 4 gemeinsam mit dem US-AMRID, dem Mikrobiologie-Institut der US-Armee, gegen Anthrax und Ebola getestet. Dabei ist die Entwicklung synthetischer TLR7-Agonisten, die eine starke Zytokinantwort induzieren, am weitesten fortgeschritten.

### Typisierung und Identifikation von Bioagenzien

Typisierungsmethoden, um natürliche von absichtlich herbeigeführten Krankheitsausbrüchen zu unterscheiden, wurden in München für so verschiedene Bioagenzien wie *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* und *Yersinia pestis*, den Erreger des Q-Fiebers *Coxiella burnetii*, den Fleckfiebererreger *Coxiella burnetii* vorgestellt. Dass Methoden wie der Multi Locus Tandem Repeat Assay (MLVA), die PCR und die sequenzierungsbasierte SNP-Detektion bei der exakten Identifizierung und geographischen Zuordnung gefährlicher Bioagenzien wie *Bacillus anthracis* helfen können, illustrierte Anthrax-„Chief Investigator“ Paul Keim (Center of Microbial Genetics and Genomics, Flagstaff, USA) eindrucksvoll am Beispiel



Abb. 3: Containment-Ausrüstung auf der begleitende Ausstellung.

der Anthrax-Briefe. Große Zukunftsaussichten bescheinigte der international renommierte Experte bei weiter sinkenden Kosten den Next-Generation-Sequencing-Verfahren. Verschiedene Sprecher gingen auch auf die Detektion von Fragmentlängen-Polymorphismen mittels Pulse Field-Gelelektrophorese (PFGE) ein, mit der sich die Genotypen von *Yersinia pestis*-Isolaten oder der Tularämie-Erreger *Francisella tularensis* exakt unterscheiden und geographisch zuordnen ließen. Eine Verbesserung der Typing-Methoden hat sich laut Mats Forsman (Universität Umea) ein Verbund von 12 Staaten zur Aufgabe gemacht. Ziel des European Biodefense Laboratory Network ist es, eine Datenbank mit hochauflösenden Typisierungsdaten aufzubauen, die bei der sicheren Identifikation von B-Waffen helfen soll.

### Detektion und Diagnose

Technische Lösungen, um die identifizierten Biomarker mit feldtauglichen Analysengeräten, Schnelltests oder sogar bloßem Auge zu identifizieren, stellten zahlreiche Unternehmen vor. Einen robusten Macroarray auf dem verschiedene immobilisierte Sonden charakteristische PCR-Amplicons von Pathogenen durch eine Pzäpitationsreaktion mit Farbumschlag anzeigen, stellte etwa die Berliner Chipron GmbH vor. Den Prototypen einer neuen dreidimensionalen Immunfiltrationsmethode zur Detektion von Bioagenzien in komplexen Pulvern präsentierte die Senova GmbH aus Jena. Die Mikrosäule ermöglichte die Detektion von nur 5 ng Material und wird derzeit für diverse Pathogene maßgeschneidert. Auch FISH-basierte Verfahren wurden präsentiert.

Von den Tagungsteilnehmern wurde das Meeting durchweg positiv beurteilt. Das nächste Update zur Bioabwehr ist in zwei Jahren geplant.

# England – offen für alternative Karrierewege

Dr. rer. nat. Claudia Pfander, Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, [cb10@sanger.ac.uk](mailto:cb10@sanger.ac.uk)

Nach Abschluss meiner Promotion wollte ich gerne in das Gebiet der Malaria-Forschung wechseln. Neben dem rein wissenschaftlichen Interesse war es ein optimaler Zeitpunkt, an der raschen Entwicklung in diesem Feld teilzuhaben. Die vermehrte finanzielle Förderung in diesem Bereich, die Veröffentlichung des *Plasmodium*-Genoms und ein starker technologischer Fortschritt haben hier in den vergangenen Jahren neue Möglichkeiten eröffnet. Großbritannien ist ein bedeutendes Zentrum der Malaria-Forschung, und in London sind gleich mehrere Labore auf diesem Gebiet aktiv. Deshalb habe ich ursprünglich dort als Post-Doc am Imperial College begonnen. Für einen temporären Auslandsaufenthalt bietet sich die Zeit nach der Promotion in der akademischen Laufbahn besonders an. Für diesen Karriereabschnitt gibt es vielfältige Fördermöglichkeiten, etwa durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) oder die EU (Marie-Curie Fellowship), bei denen der internationale wissenschaftliche Austausch im Vordergrund steht. Einige Geldgeber unterstützen auch explizit einen Themenwechsel (z.B. Human Frontiers). Ein Auslandsaufenthalt ist für Wissenschaftler nahezu obligatorisch, und meine Erfahrungen als Student in Edmonton waren durchgängig positiv. Während meiner Zeit in Kanada kam es mir neben meinen Studien vor allem darauf an, Einblicke in ein anderes Bildungssystem zu erhalten und neue kulturelle Erfahrungen zu machen. Für die Wahl meiner Post-Doc-Stelle stand hingegen der Wunsch im Vordergrund, meinen eigenen Forschungsinteressen nachgehen zu können.

## Mumien und Curry Houses

Die Engländer sind stolz auf ihre politische und wissenschaftliche Tradition, und man begegnet ihren Spuren teilweise auf absurde Art. Der berühmte Sozialreformer Jeremy Bentham etwa nimmt auch 180 Jahre nach seinem Tode noch an Jubiläumssitzungen des University College in London teil – als Mumie. Ich habe mich sehr schnell in England eingelebt und schätze das multinationale Umfeld an meinem Wohn- und Arbeitsplatz. 700.000 Ausländer leben allein in London, und sind neben den Briten im kulturellen Leben stark präsent. Und um alle indischen Curry-Häuser auszuprobieren, bräuchte man wohl Jahre.

Nach anderthalb Jahren hatte ich die Möglichkeit, zusammen mit meinem Gruppenleiter an das Sanger Institut des Wellcome Trust zu wechseln, das gerade seinen Bereich „Pathogen“ erweitern wollte.

## Nicht nur bench work

Dort entstand unter Einfluss meines Chefs ein völlig neues, hochmodernes Malaria-Labor. Der Wellcome Trust ist mit ca. 600 Mio. £ jährlich der größte nichtstaatliche Geldgeber für biomedizinische Forschung. Die Stiftung gibt gemeinnützige Richtlinien für von ihr geförderte Projekte vor, wie „open access“ für wissenschaftliche Daten und Technologietransfer zwischen Institutionen. Wissenschaftliche Projekte sind dort in längerfristige Programme eingebunden, vergleichbar etwa mit einem Sonderforschungsbereich (SFB) in Deutschland.

Der Forschungsschwerpunkt unseres Labors ist die Aufklärung der biologischen Vorgänge bei der Übertragung von Malaria auf die Mücke und damit der weiteren Verbreitung der Krankheit. Wir benutzen dabei ein Mausmodell für unsere genetischen und zellbiologischen Studien, das uns erlaubt, den gesamten Lebenszyklus des Parasiten zu untersuchen. Neben der Untersuchung grundlegender biologischer Fragestellungen, etwa im Bereich Signaltransduktion, beschäftigen wir uns auch mit der Validierung von Daten aus verschiedenen Kooperationen inner- und außerhalb des Instituts. Ein Projekt untersucht die *in vivo*-Wirkung auf Parasitenwachstum und Transmission von Leitstrukturen eines Industriepartners. In einem anderen Projekt überprüfen wir die Ergebnisse aus genomischen Studien an klinischen Proben durch gezielte Mutationen in Parasiten- und Wirtsgenen.

Als Scientific Project Manager bin ich an der Koordination einiger dieser Projekte, der technologischen Entwicklung im Bereich genetische Validierung und dem Aufbau von Kollaborationen beteiligt und trage gleichzeitig Verantwortung für das technische Personal. Gutes Team- und Zeitmanagement sind hier unverzichtbar, denn viele Experimente müssen an die Zeitpläne und Arbeitsbelastungen anderer Gruppen angepasst werden, wie etwa im Bioinformatikbereich. In der Technologie-Entwicklung ist ein enger wissenschaftlicher Kontakt mit anderen Malaria-Gruppen weltweit wichtig, um bereits im Vorfeld sicherzustellen, dass von uns entwickelte Methoden eine breite



Den Studiengang Chemie und meine Diplomarbeit in Biochemie absolvierte ich von 1995 bis 2000 an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster und dem Max-Planck-Institut (MPI) für Molekulare Physiologie in Dortmund. Von 1998 bis 1999 verbrachte ich mit einem Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdiensts (DAAD) ein Jahr am Biochemischen Institut der University of Alberta in Edmonton, Kanada. Nach der Diplomarbeit verließ ich die Chemie und promovierte von 2000 bis 2005 am MPI für Biochemie. Seit 2006 arbeite ich in England, davon zunächst 1 1/2 Jahre als PostDoc am Imperial College London. Derzeit bin ich als Wissenschaftler am Wellcome Trust Sanger Institute in Cambridge angestellt.

Anwendung finden. Meine Position ermöglicht mir die Weiterbildung im Managementbereich und gibt mir gleichzeitig die Möglichkeit, ein eigenes Forschungsprojekt zu bearbeiten. Die Stelle ist ein Beispiel dafür, dass akademische Karrieremöglichkeiten in Großbritannien vielfältiger sind als in Deutschland. Es ist nicht unüblich, mehrere Post-Doc-Stellen zu durchlaufen oder mittelfristig als wissenschaftlicher Mitarbeiter zu arbeiten, bevor man Gruppenleiter wird oder in die Industrie wechselt. Forschungsinstitute haben in der Regel eine gut ausgebaute „core facility“ für wissenschaftliche Dienstleistungen, in denen feste Mitarbeiter einen dauerhaften Standard garantieren und technisches Know-how aufgebaut und bewahrt wird. Die berufliche Entwicklung wird als der Erwerb einer Sammlung von relevanten Erfahrungen angesehen und die generelle Akzeptanz von alternativen Karrierewegen ist hoch. Man wird an vielen Stellen ermutigt, sich entsprechend der persönlichen Interessenslage weiterzubilden. Diese Einstellung möchte ich mir bei einer etwaigen Rückkehr bewahren – der Erfolg in einem Job hängt schließlich sehr davon ab, dass man mit Begeisterung bei der Sache ist.

# Marktübersicht: Proteinexpression

Jedes Labor braucht sie, und das Angebot an Proteinexpressionssystemen ist unterdessen riesengroß. Maßgeschneidert auf die jeweiligen Bedürfnisse gibt es zellfreie Systeme, bakterielle, die aber unter Umständen Inclusion Bodies bilden und teils aufwendige Rückfaltungsmaßnahmen erfordern, oder aber Systeme die spezifische posttranslationale Modifikationen gestatten, ohne die das Protein von Interesse nicht funktionell exprimiert würde. Das aktuellen Kits der Hersteller hat LABORWELT für Sie in der vorliegenden Marktübersicht\* zusammengestellt.

<b>Firma/Kontakt</b>	<p><b>ATG-biosynthetics GmbH</b> Dr. Hubert S. Bernauer Weberstr. 40 79249 Merzhausen inquiry@atg-biosynthetics.de www.atg-biosynthetics.com</p>	<p><b>Biomol GmbH</b> 22769 Hamburg Waidmannstr. 35 www.biomol.de Dr. Edgar Lipsius Tel.: +49-(0)40-853260-37</p>	<p><b>Biozym Scientific GmbH</b> (Vertrieb für Finnzymes Oy in D und A) Steinbrinksweg 27 31840 Hessesch Oldendorf Tel.: +49-(0)5152-9020 Fax: +49-(0)5152-2070 support@biozym.com, www.biozym.com Helmut Prechel</p>
<b>Produktname</b>	<p>ACEMBL – multiplex Proteinexpression Vector-Systems</p>	<p>APX™ System – Adjustable Protein Expression</p>	<p>Replicator™ RNAi-Kit ( F-610); PowerCut™ Dicer (F-602)</p>
<b>Beschreibung</b>	<p>ACEMBL – flexBAC – Multiplex-Expressionsvektoren ist ein Donor-Akzeptor-Plasmid-basiertes System. Expressionskassetten von Genen können leicht mit SJC (sequence and ligation independent cloning) wie auch mittels zyklischer Homingnuclease-Reaktion seriell zusammengeschnitten werden. Cre-Lox-Recombineering kann zur Integration verschiedener Donoren mit Akzeptoren zu großen stabilen Genclustern verwendet werden. Auf die Rekombinationsprodukte kann selektiert werden. Das System ist für die Konstruktion funktioneller Proteinkomplexe und für die Erzeugung von künstlichen Biokatalysepathways konzipiert. Es kann leicht zu Shuttle-Vektoren für andere Expressionssysteme umgebaut werden.</p>	<p>Expressionsvektor fusioniert gewünschtes Zielprotein mit einer Destabilisierungsdomäne (DD). Das Expressionsniveau lässt sich mittels eines DD-Liganden regulieren, der das Fusionsprotein vor proteasomaler Degradation schützt.</p>	<p>Kits inklusive aller Komponenten zur Produktion von Milligramm-Mengen dsRNA (aus dsDNA) und siRNA für Gene Silencing-Studien</p>
<b>Art des Expressionssystems</b>	<p>ACEMBL-EC für <i>E. coli</i>-Zellen und ACEMBL für fortgeschrittene Baculovirus-Expression sind gegenwärtig verfügbar.</p>	<p>Eukaryotische Expression in Säugerzellen</p>	<p>Prozedur: (1) Das geeignete dsDNA-Template wird durch PCR mit der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase erzeugt. (2) T7-RNA-Polymerase erstellt ssRNA-Kopien aus dem dsDNA-Template. (3) Phi6-RNA-Replase konvertiert das erzeugte ssRNA-Molekül in dsRNA. (4) PowerCut™ Dicer produziert 25-27 Nukleotid lange siRNA-Moleküle aus dsRNA.</p>
<b>Art/Menge Ausgangsmaterial</b>	<p>DNA-Handling bei ACEMBL-Systemen entspricht Standardprozeduren.</p>	<p>Menge der DNA-Plasmide oder Lentiviruspartikel abhängig von Zelltyp und experimentellen Bedingungen (s. Protokoll)</p>	<p>dsDNA bzw. dsRNA</p>
<b>Proteinaufreinigung/-selektion/-detektion</b>	<p>ACEMBL-Vektoren sind für fünf verschiedene Selektionsmarker verfügbar.</p>	<p>Protein-Akkumulation oder -Depletion kann über Western-blot u. a. Methoden detektiert werden.</p>	<p>k. A.</p>
<b>Ausbeute</b>	<p>Die Ausbeute ist von der Konstellation der transkriptionalen und translationalen Regulatoren der 5'-Trailersequenz und der translationalen Sequenz abhängig. Die translationale Initiationsfrequenz und die Elongation kann von ATG optimiert werden.</p>	<p>Protein-Produktion je nach Manipulation der Expressionshöhe</p>	<p>Milligramm-Mengen dsRNA – perfekt doppelsträngig Keine „Schmier-Produkte“ durch RNA-Sekundärstrukturen 100% Verdau-Effizienz ergibt maximale siRNA-Ausbeuten Produziert 25 bis 27 Nukleotide lange siRNAs mit starker Silencing-Funktion</p>
<b>Zeitbedarf</b>	<p>ACEMBL-Systeme sind für ein Maximum an Handling-Flexibilität konzipiert</p>	<p>je nach Inkubationsdauer mit oder ohne Proteinstabilisierungs-Reagenz (s. Protokoll)</p>	<p>dsRNA-Produktion: ca. 5 h; dsRNA-Verdau: ca. 16 h</p>
<b>Besonderheiten/Extras</b>	<p>Der konditionale ORI R6K der Donoren sind pir<sup>+</sup>-abhängig und kompatibel mit dem Col E1 des Acceptor-Plasmids.</p>	<p>als transfektionstaugliche Plasmide oder transduktionsfertige lentivirale Partikel erhältlich; Vektoren sowohl für regulierbare Expression von DD-Fusionsproteinen als auch für konstitutive Expression von DYDDDK-Tag-Proteinen verfügbar; sowohl „leere“ Vektoren zur Klonierung des gewünschten Zielproteins als auch rekombinante Plasmide mit validierten ORFs erhältlich</p>	<p>Kein RNA-Hybridisierungsschritt im Protokoll   Produktion auch von langen dsRNA-Fragmenten – bis zu 20 kb   Kein Überreaktion beim dsRNA-Verdau   Resultierende siRNA bleibt völlig intakt</p>
<b>Preis</b>	<p>APX Plasmids: 755 Euro   APX Lentivirus: 659 Euro</p>	<p>APX Plasmids: 755 Euro   APX Lentivirus: 659 Euro</p>	<p>Listenpreise: F-610 (40 rxn á 50 µl) 340 Euro   F-602 (60 U) 75 Euro</p>

\* Datenbasis: Rücklauf aus Befragung der Anbieter

<b>Firma/Kontakt</b>	<b>Dualsystems Biotech AG</b> Grabenstr. 11a CH-8952 Schlieren Tobias Dietschy, PhD	<b>IBA GmbH</b> Rudolf-Wissell-Str. 28 37079 Göttingen Tel.: +49-(0)551-50672-0 Dr. Isabel Schuchardt info@iba-go.com www.strep-tag-com	<b>Invitrogen GmbH</b> Frankfurter Str. 129B 64293 Darmstadt euroinfo@invitrogen.com www.invitrogen.com Tel: 0800-083-09-02 Fax: 0800-083-34-35	<b>Merck Chemicals Ltd.</b> Padge Road, Beeston Nottingham, NG9 2JR, UK www.merck4biosciences.com customer.service@merckbio.eu FreePhone: 0800 6931 000 FreeFax: 0800 6236 100	<b>MobiTec GmbH</b> www.mobitec.com info@mobitec.com
<b>Produktname</b>	KickStart protein expression kit	One-STREP Set	pcDNA™ 3.3-TOPO® TA Cloning®-Kit	Proteinexpression in Insektenzellen (InsectDirect, BacMagic und BacVector)	High Yield T7-RNA-Polymerase-Gene-Expression-System for Bacillus megaterium
<b>Beschreibung</b>	pKS1 Expressionsplasmid mit ADH2-Promoter; keine Induktion nötig   KanMX-Kassette: Selektion mit G418 in komplettem Medium   DSY-5 Helfer-Stamm: Protease-defizient	Klonierung/Expression/Isolierung/ Detektion von Proteincomplexen und die Identifizierung von Proteininteraktionspartnern basierend auf dem One-STREP-tag-System. Das Set enthält: Je 2 Expressionsvektoren (link. Klonierungskit für N- und C-terminale Fusion mit dem One-STREP-tag), Strep-Tactin-Säulen, Puffer und Antikörper für die Reinigung und Detektion der exprimierten Proteine; Kontrollen für Klonierung und Expression	Der pcDNA™ 3.3-TOPO®-Vektor ist für hohe Ausbeuten für native Proteine und eine transiente und stabile Expression entwickelt worden. Der Vektor verfügt über die CMV immediate-early Promoter/Enhancer Sequence. TA Kits werden mit allen Reagenzien für die Klonierung und dem TOPO®-adapted Plasmid-Vektor, One Shot®-TOP10 kompetente Zellen geliefert.	Verschiedene Expressionssysteme verfügbar: a) InsectDirect: Plasmid-basiertes System für transiente Expression mit hoher Ausbeute bzw. kontinuierliche Expression von stabil infizierten Zellen; b) BacMagic und BacVector: Systeme, die auf der Infektion mit rekombinanten Baculovirus beruhen. Breite Auswahl an Expressionsvektoren für verschiedenste Fragestellungen. Auswahl verschiedener N-terminaler und C-terminaler Tags für Detektion und Aufreinigung	Zwei-Plasmid-System (pT7-RNAP und pPT7) reguliert durch Xylose-Operon und T7-RNA-Polymerase.   Hochregulierte, stabile Proteinexpression mit hoher Ausbeute in Bacillus megaterium (Stamm MS941);   Im Kit enthalten: pPT7 (E. coli / B. megaterium shuttle-Vektor); Kontrollvektor pPT7-GFP; vortransformierte (pT7-RNAP) B. megaterium-Protooplasten;
<b>Art des Expressionssystems</b>	Hefe-Expressionssystem	sowohl für <i>E. coli</i> als auch für Mammalia erhältlich	adhärente und Suspensions-Kulturen sowie für FreeStyle™ MAX CHO-Zellen	Eukaryontisches Expressionssystem, ermöglicht posttranslationale Modifikation	Prokaryotisch (B. megaterium)
<b>Art/Menge Ausgangsmaterial</b>	1,5 µg gereinigtes Expressionsplasmid	PCR-DNA des amplifizierten Gens	10-100ng DNA Template, (5-10ng bei Verwendung von Plasmid DNA, 30-100ng bei Verwendung von genomischer DNA als Template in der PCR-Reaktion)	PCR-DNA bzw. restriktionsverdauter DNA des Zielgens für Ligation	DNA wird in pPT7 einkloniert, in <i>E. coli</i> propagiert und dann in <i>B. megaterium</i> transformiert + exprimiert.
<b>Proteinaufreinigung/-selektion/-detektion</b>	Strep/HA-tag für spezifische Aufreinigung/ Selektion mit G418/ Detektion mit HA-Antikörper	Das One-STREP-Set ermöglicht die Klonierung/ Expression/ Aufreinigung und Detektion von Proteinen (Proteincomplexen) alles mit einem Set.	Reinigung: Methoden für natives Proteine, (z.B. Protein A/G Dynabeads®)   Selektion: Ampicillin ( <i>E. coli</i> ) und Gentamicin (Zelllinien)   Detektion: Detektionsantikörper (nicht im Kit)	angehängte Protein-Tags nutzbar zur anschließenden Proteinaufreinigung per Affinitätschromatographie bzw. zum immunologischen Nachweis des getaggten Proteins	Selektion durch Ampicillin Chloramphenicol und Tetrazyklin-Resistenz; Proteinaufreinigung durch Aceton-Präzipitation/ SDS-PAGE bzw. Expression von markierten Proteinen
<b>Ausbeute</b>	Abhängig von Protein und Kulturgröße im Milligramm-Bereich	k. A.	Klonierungsausbeuten > 85%, 5-fach erhöhte Proteinausbeuten im Vgl. zu herkömmlichen Systemen (~8-30mg/L)	Ausbeute ist spezifisch für das jeweils exprimierte Protein	Sehr hohe Ausbeute (12,8 mg l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> GFP) im Vergleich zu einem Standard-Xylose-induzierbaren System (2mg l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) (Gamer et al., 2009)
<b>Zeitbedarf</b>	von Klonierung bis Proteinreinigung ca. 1 Monat	Klonierung (ca. 3-4Tage) + Expression/Reinigung/Detektion (ca. 2-3 Tage)	5 min Klonierung und Expression von amplifizierten PCR-Produkten in Säugerzellen	a) InsectDirect: 48-72 Stunden b) BacMagic-System: 10 Tage c) BacVector-System: 20 Tage	Von Transformation in <i>E. coli</i> bis zur hohen Proteinausbeute in <i>B. megaterium</i> : ca. 5 Tage
<b>Besonderheiten/ Extras</b>		kann auch separat (als Cloning-Kit oder Purification-Kit) bestellt werden; basiert auf StarGate-Subklonierungssystem, welches eine Vielzahl von weiteren Expressionsvektoren beinhaltet	Schnelle, einfache und effiziente Klonierung, 5-fach höhere Ausbeuten als herkömmliche Systeme   OptiCHO™ Antikörper-Expressions-System für die Sekretion ins Medium, FreeStyle™ Max für die Bioproduktion	Vektor verfügbar zur Anwendung sowohl in InsectDirect- als auch in Baculovirus-System.	Erstes kommerziell erhältliches T7 RNA Polymerase Expressions-System für <i>Bacillus megaterium</i> ; mit pT7-RNAP vortransformierte <i>B. megaterium</i> -Protooplasten zur leichten Transformation und Kontrollvektor pPT7 im Kit; hohe Ausbeute; hohe proteolytische Stabilität der Proteine, da <i>B. megaterium</i> keine alkalinen Proteasen produziert; Verwendung eines GRAS (Generally Recognized As Safe) Wirtes
<b>Preis</b>	630 Euro	1.190 Euro ( <i>E. coli</i> -Expression) für komplettes Set	822 Euro für 20 Reaktionen		972 Euro (zzgl. MwSt. und Fracht)

<b>Firma/Kontakt</b>	m2p-labs GmbH Forckenbeckstr. 6 52074 Aachen Tel.: 0241-608513120 www.m2p-labs.com	New England Biolabs GmbH Brüningstraße 50, Geb. 810 65926 Frankfurt am Main Dr. Carsten Lanwert	New England Biolabs GmbH Brüningstraße 50, Geb. 810 65926 Frankfurt am Main Dr. Carsten Lanwert	New England Biolabs GmbH Brüningstraße 50, Geb. 810 65926 Frankfurt am Main Dr. Carsten Lanwert	New England Biolabs GmbH Brüningstraße 50, Geb. 810 65926 Frankfurt am Main Dr. Carsten Lanwert	Promega GmbH Schildkrötstraße 15 68199 Mannheim Dr. Truc N. Bui
<b>Produktname</b>	m2p fedbatch medium	PURExpress™ In Vitro Protein Synthesis Kit (E6800)	IMPACT™ Kit (E6901 S)	K. lactis Protein Expression Kit (E1000 S)	S30 T7 High-Yield Protein Expression System	
<b>Beschreibung</b>	One-Stop-Cultivation: komplexe und synthetische Glucose-Fedbatch-Medien für hohe Zelldichten und hohe Proteinexpression – Variation von Wachstums- und Expressionsraten	Zellfreie definierte in vitro-Proteinsynthese mittels hochreinen rekombinanten Komponenten des E.coli-Transkriptions/Translationsapparates	E. coli-Expressionssystem zur Herstellung und Aufreinigung tag-freien Zielproteins	optimales Hefeexpressionssystem zur Herstellung von sekretiertem Zielprotein	Expression hoher Mengen löslicher Proteine in vitro mit Vektoren, die einen T7-Promotor und Ribosombindungsstellen enthalten	
<b>Art des Expressionssystems</b>	E. coli, Pichia pastoris, Hansenula polymorpha	Zellfreies System für unmodifizierte Proteine	Prokaryotisches Expressionssystem	Hefe Kluyveromyces lactis für translational modifizierte Proteine	Das System eignet sich für die Expression von Proteinen, die in E. coli schwer exprimierbar sind.	
<b>Art/Menge Ausgangsmaterial</b>	Vom Anwender frei wählbar	PCR- oder Plasmid-DNA	Plasmid-DNA	Plasmid-DNA	1 µg DNA	
<b>Proteinaufreinigung/-selektion/-detektion</b>	Alle Standard-Aufreinigungsschritte	„negative“ Aufreinigung: d.h. alle Proteinfaktoren des Kits können mittels His-Tags entfernt werden   Dank definiertem System ohne Fremdaktivitäten oftmals Aufreinigung nicht notwendig	Expression des Zielproteins als N- oder C-terminales Fusionsprotein mit Intein- und Chitin-Bindungs-Domäne.   Affinitätschromatografische Aufreinigung über Chitin-Säulen oder magnetische Beads.   Affinitätstag spaltet sich in Gegenwart reduzierender Reagenzien im Elutionspuffer selbstständig ab – keine Protease notwendig	Einfache und zuverlässige Expression des Zielproteins als sekretiertes und post-translational-modifiziertes Protein.   Einfache Aufreinigung großer Mengen des Zielproteins aus dem Wachstumsmedium (Überstand)	Exprimierte Proteine können entweder direkt im Coomassie®-Gel oder mit [ <sup>35</sup> S] Methionin oder indirekt zunächst durch Einbau von biotinylierter bzw. Fluoreszenz-markierter tRNA sichtbar gemacht werden.	
<b>Ausbeute</b>	Protein: >> 100 mg/L, Biomasse: OD > 40	Analytischer Maßstab	Präparativer Maßstab	Präparativer Maßstab	Bis zu 500 µg/ml Protein	
<b>Zeitbedarf</b>	5 min Medienansatz	1 Stunde	2 Tage	7 Tage	1 h	
<b>Besonderheiten/Extras</b>	Glucose-limitierter Fedbatch für Schüttelkolben und Mikrotitreplatten – auf Fermenter skalierbar, keine Dosierpumpen notwendig	Schnelle zellfreie Herstellung von analytischen Mengen des Zielproteins zur weiteren funktionellen Charakterisierung Expression von Proteinen, die in herkömmlichen Wirtszell-Systemen toxisch und nicht exprimierbar sind	Ergibt native Proteine ohne zusätzliche Aminosäuren vom Affinitäts-Tag   Ein-Schritt Affinitäts-Aufreinigung: Fusionspartner wird ohne Proteasen freigegeben!   Zielprotein kann C-terminal markiert werden;   N- oder C-terminale Fusionen möglich	Expression von prokaryotischen und eukaryotischen (glykosylierten) Proteinen in jedem Maßstab   sehr hohe Proteinausbeuten, durch stabile Rekombination ins Hefe-Genom   Fed-Batch Fermentierung möglich, da keine Zell-Lyse notwendig; Einfache Aufreinigung aus Wachstumsmedium durch Sekretion des Zielproteins   besonders einfaches Handling, daher ideal für Hefe-Expressions-Einsteiger	Expression von toxischen Proteinen, keine Bildung von Inclusion Bodies, Proteine direkt für Downstream-Anwendungen einsetzbar	
<b>Preis</b>	30 Euro / 125 mL	212,- Euro	280,- Euro	630,- Euro	152,- Euro (8 Reaktionen), 378,- Euro (24 Reaktionen)	

<b>Firma/Kontakt</b>	<p><b>PromoCell GmbH</b> Sickingenstraße 63 / 65 D-69126 Heidelberg Tel: +49-(0)6221-64934-0 Fax: +49-(0)6221-64934-40 www.promokine.de info@promokine.de Dr. Jürgen Becker</p>	<p><b>QIAGEN GmbH</b> QIAGEN Str. 1 40724 Hilden www.qiagen.com/goto/EasyXpress Dr. Jutta Drees jutta.drees@qiagen.com</p>	<p><b>SERVA Electrophoresis GmbH, Carl-Benz-Str. 7</b> 69115 Heidelberg www.serva.de Dr. Judith Koch Tel.: +49-6221-13840-44; Tech.Service@serva.de</p>	<b>Thermo Fisher Scientific</b> Dr. Carolin Kutzki
<b>Produktname</b>	FastExpress Gene Expression Kits (zur in vitro-Genexpression)	EasyXpress Protein Synthesis Insect Kits II	StabyExpress™ T7 Expression Kit	Pierce Human In Vitro Protein Expression Kit – DNA or mRNA Pierce Human In Vitro Glycoprotein Expression Kit – DNA or mRNA
<b>Beschreibung</b>	Mit den FastExpress Gene Expression Kits wird mittels zweier einfacher PCR-Schritte eine Genexpressions-Kassette – bestehend aus einem starken Promotor, dem Zielgen und einer Terminatorsequenz – hergestellt. Nach Transfektion der mammalen Zellen mit dieser Expressions-Kassette wird das gewünschte rekombinante Protein in den Zellen effizient exprimiert, wahlweise mit oder ohne HA-Tag. Der Kit enthält die erforderlichen Primer und DNA-Fragmente für die Promotor- und Terminatorsequenzen, die im 2. PCR-Schritt mit dem Zielgen fusioniert werden, sowie ein GFP-Kontroll-Tempalte und entsprechende Kontrollprimer. Außerdem wird noch eine hocheffiziente, liposomale Transfektionsreagenz (PromoFect) mitgeliefert.	Kits für zellfreie Expression von Proteinen in Insektenzell-Extrakten	Antibiotikafreie Vektorstabilisierung und Selektion mittels Gift/Gegengift-System (vektorcodiertes ccdA Gen [=antidote] und chromosomal codiertes ccdB-Gen [poison]); T7-Technologie zur Expression; Kit enthält wahlweise chemisch oder elektrokompetente Zellen für Klonierung (CYS21) und Expression (SE1); Reverse und Forward Primer zur Analyse der Konstrukte enthalten	Cell-free expression in specialized human lysates, T7 based plasmid, high yield, correct N-glycosylation pattern, clean product
<b>Art des Expressionssystems</b>	Eukaryotisches Expressionssystem, Expression von Proteinen inklusive post-translationaler Modifikationen (Glykosylierung, Phosphorylierung), auch für die Expression von Membranproteinen	Eukaryotisches Expressionssystem, Expression von Proteinen inklusive post-translationaler Modifikationen (Glykosylierung, Phosphorylierung), auch für die Expression von Membranproteinen	T7/His-Expression in E. coli (SE1); prokaryontisch, optimierte heterologe Genexpression durch vektorbasierte, seltene tRNAs: ileX, leuW, proL, glyT, argU	eukaryotic, human cell lysate, human N-glycosylation pattern, also for large proteins
<b>Art/Menge Ausgangsmaterial</b>	Ausgangsmaterial: 0,5 - 1,5 µg DNA: Vektor oder PCR-Produkt mit T7-Promotor oder QIAGene Expression Kit – Insect/ Mammalia (www.qiagen.com/goto/QIAGenes)	Ausgangsmaterial: 0,5 - 1,5 µg DNA: Vektor oder PCR-Produkt mit T7-Promotor oder QIAGene Expression Kit – Insect/ Mammalia (www.qiagen.com/goto/QIAGenes)	PCR-DNA (Möglichkeit der Software-basierten Optimierung der Primer-Sequenz zur optimalen Proteinexpression vorhanden), ca. 0,3 pmol	1 µg of cloned DNA or 1 µg of mRNA
<b>Proteinaufreinigung/-selektion/-detektion</b>	Kit zur Herstellung linearer DNA als Ausgangsmaterial (über PCR) beinhaltet Primer, die für His und Strep-tag codieren, d. h. Aufreinigung und Detektion über His- und Strep-tag	Kit zur Herstellung linearer DNA als Ausgangsmaterial (über PCR) beinhaltet Primer, die für His und Strep-tag codieren, d. h. Aufreinigung und Detektion über His- und Strep-tag	Proteinaufreinigung: His-Tag, in der Variante CherryExpress zusätzliches N-terminales Fusionsprotein vorhanden; Selektion: ccdA/ccdB Operon zur antibiotikafreien Selektion, zusätzliche Selektion über Amp-Resistenz verfügbar; Detektion: His-Antikörper, in der Variante CherryExpress zusätzlich über Cherry-tag (Rotfärbung)	k. A.
<b>Ausbeute</b>	Bis zu 50 µg/ml	Bis zu 50 µg/ml	Drei- bis fünfmal höher als vergleichbare auf Antibiotikaselektion basierende Systeme in BL21 (DE3), absolute Mengenausbeute ist proteinabhängig	Up to 40 µg/ml
<b>Zeitbedarf</b>	Proteinexpression in 3,5 h; Herstellung von linearer DNA als Ausgangsmaterial über PCR: 5,5 h	Proteinexpression in 3,5 h; Herstellung von linearer DNA als Ausgangsmaterial über PCR: 5,5 h	Ligation + Transformation (1h) in CYS21 mit anschließender Inkubation über Nacht, Identifikation positiver Klone, Transformation in SE1 und anschließende Expression	150 – 180 minutes
<b>Besonderheiten/ Extras</b>	Für die Expression von Membranproteinen bzw. Proteinen mit posttranslationalen Modifikationen werden keinerlei weitere Zusätze benötigt	Für die Expression von Membranproteinen bzw. Proteinen mit posttranslationalen Modifikationen werden keinerlei weitere Zusätze benötigt	In den Variante CherryExpress zusätzliches N-terminales Fusionsprotein für erhöhte Löslichkeit und Quantifizierung; in der Variante StabyCodon bzw. CherryCodon trägt der Expressionsvektor zusätzlich seltene tRNAs für effiziente heterologe Genexpression; für das Auge durch deutliche Rotfärbung sichtbare Expression durch CherryTag; StabySwitch-Medium für vereinfachte, iPG-freie, auto-induzierte Expression	k. A.
<b>Preis</b>	229 Euro (20 Reaktionen) bzw. 625 Euro (100 Reaktionen)	Kit mit 20 x 50 µl: 563 Euro; Kit mit 5 x 5 µl: 145 Euro, beide inklusive aller benötigter Reagenzien	Je nach Kit zwischen 300,- Euro (5 Reakt.) und 900,- Euro (20 Reakt.)	300-600 Euro/50 reactions

# Akademischer Stellenmarkt

Veröffentlichen Sie Ihre Stellenanzeigen zielgruppengerecht in unserem akademischen Stellenmarkt (auch online), der allen nicht-kommerziellen Instituten für ihre Stellenausschreibungen kostenlos zur Verfügung steht. Bitte senden Sie dazu Ihre Anzeige (1/4 Seite 90 mm breit x 122,5 mm hoch, Logo-jpg oder tiff, 300 dpi Auflösung) an [a.macht@biocom.de](mailto:a.macht@biocom.de). Annahmeschluss für die nächste LABORWELT-Ausgabe „Bioanalytik“ (Erscheinungstermin 18.03.2010) ist der 5. März 2010.



**Cologne International  
Graduate School**  
From Embryo to old Age,  
Development, Health and Disease  
**8 Fellowships**  
3-year Ph.D. programme starting fall 2010

The University of Cologne has a long-standing tradition and world-wide reputation for top-level molecular biological research. Beginning in Fall 2010 the Research School in Biology "From embryo to old age: the cell biology and genetics of health and disease" will be offering a high-level Ph.D. programme for students with excellent qualifications. The participating research groups use **microbial, plant** and **animal** model systems to investigate cell biological and genetic mechanisms whose perturbation during the life cycle of an organism results in disease.

The three-year programme starts with a six-month rotation and course period, followed by a PhD project in one of the participating groups. Seminars and training courses complement the research work. Comprehensive support is provided throughout the programme. The programme language is English. Accepted students will receive a laptop computer and 500 EUR to get started in Cologne. No tuition fees are charged.

Eight competitive three-year fellowships (initially 1100 EUR, then 1400 EUR per month) are available.

We invite you to apply to the IGSDHD in Cologne, the exciting city in the heart of Europe.

To obtain further information please visit our website at:  
<http://www.uni-koeln.de/bio-graduateschool/>

**Submission deadline for complete applications is April 15, 2010**

Contact: Dr. Isabell Witt, IGSDHD, Zülpicher Strasse 47,  
D-50674 Cologne, Email: [isabell.witt@uni-koeln.de](mailto:isabell.witt@uni-koeln.de),  
Phone: +49 (0) 221 470 1683, Fax: +49 (0) 221 470 1632



Der Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Anatomie  
der Universität Regensburg  
sucht zum nächstmöglichen Zeitpunkt

## Doktorandinnen/Doktoranden

Im wissenschaftlichen Fokus des Lehrstuhls stehen zwei Erbkrankheiten der Niere (polyzystische Nierenerkrankung, Nagel-Patella-Syndrom). Bei der polyzystischen Nierenerkrankung geht es vorwiegend um das Polycystin-2 Protein, einen nichtselektiven Kationenkanal aus der Familie der TRP-Proteine. Untersucht werden sollen der intrazelluläre Transport von Polycystin-2 und anderer Zysten-assoziiierter Proteine zum und im primären Zilium sowie die funktionelle Bedeutung spezifischer Domänen von Polycystin-2. Im Falle des beim Nagel-Patella-Syndrom mutierten Transkriptionsfaktors LMX1B geht es ebenfalls um die funktionelle Charakterisierung individueller Domänen, um die Regulation der Zielgene und die Steuerung der Differenzierung von Podozyten durch LMX1B. Angewendet werden ein breites Spektrum an ultrastrukturellen, biochemischen, molekular- und zellbiologischen Arbeitstechniken sowie Tiermodellen. Die Universität Regensburg besitzt neben der Universität Erlangen den einzigen Sonderforschungsbereich zum Thema Niere (SFB 699 „Strukturelle, physiologische und molekulare Grundlagen der Nierenfunktion“), an dem der Lehrstuhl mit eigenen Projekten beteiligt ist.

### Nähere Auskünfte/Bewerbungen:

Prof. Dr. Ralph Witzgall,  
Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Anatomie,  
Universität Regensburg, Universitätsstr. 31, 93053 Regensburg  
Tel. 0941/943-2820/2821; Fax 0941/943-2868  
E-Mail: [ralph.witzgall@vkl.uni-regensburg.de](mailto:ralph.witzgall@vkl.uni-regensburg.de)



Our department has a strong experience in diagnostics and research of viral heart disease and belongs to the University Hospital Tübingen, Germany.

The aim of our research is to identify molecular factors in the pathogenesis of enteroviral heart disease

The Department of Molecular Pathology invites applications for a

## Postdoctoral Scientist – Experimental Virology/Immunology

### Job Description:

Our research focuses on coxsackievirus B3 myocarditis in immunocompetent and immunodeficient mice as model systems for enteroviral myocarditis in humans. We are interested to identify immune-mediated parameters and signalling pathways in vitro and in vivo, explaining the different outcome of viral myocarditis in patients (Circ Res. 2009;104:851)

### Your Qualifications:

- PhD degree in biology/biochemistry or medicine
- A strong background in molecular, virological and immunological techniques is preferred
- Interested to work in an interdisciplinary research team
- Highly motivated and team oriented
- Experience with mouse models would be very helpful

### Our Offer:

- Working in an innovative, well-equipped and scientifically stimulating surrounding
- Initial employment contract for three years (DFG, SFB-TR19) with a standard public service salary

Applications should be sent (also via e-mail) until 15.03.10 to:

Prof. Dr. med. Karin Klingel  
Abt. Molekulare Pathologie  
Universitätsklinikum Tübingen  
Liebermeisterstr. 8 · 72076 Tübingen · Germany  
E-Mail: [karin.klingel@med.uni-tuebingen.de](mailto:karin.klingel@med.uni-tuebingen.de)

## Karriere beginnt bei uns



## Gruppenleiter

### Lehrstuhl für Biotechnologie

**Unser Profil:**

Die Kernkompetenz der Arbeitsgruppe von Prof. Schwaneberg ist das evolutive und rationale Design von Proteinen. Projekte reichen von Grundlagenforschung zur Aufklärung von Struktur-Funktionsbeziehungen und deren Modellierung, Methodenentwicklungen für Gelenkte Evolution bis zur Optimierung von Biokatalysatoren für die industrielle Stoffproduktion und für medizinische Anwendungen.

In einem direkt finanzierten Großindustrieprojekt, einem DBU- und einem BMBF-geförderten Projekt suchen wir einen promovierten wissenschaftlichen Mitarbeiter, drei wissenschaftliche Mitarbeiter zur Promotion, und eine Technische Mitarbeiterin. Darüber hinaus wird ein Gruppenleiter gesucht, der die Arbeitsgruppe (Hochdurchsatzdurchmusterung) High-throughput-screening-Technologien mit fünf Doktoranden leitet und Durchmusterungstechnologien weiterentwickelt.

**Ihr Profil:**

Eine Promotion wird vorausgesetzt. Für die Gruppenleiterstelle mit langfristiger Perspektive werden Erfahrungen im Bereich von Durchmusterungstechnologie, Führung von Mitarbeitern, Projektmanagement und eine sehr gute Publikationsleistung vorausgesetzt.

**Ihre Aufgaben:**

Entsprechend Meilensteinplanungen in Drittmittelprojekten

**Unser Angebot:**

Die Einstellung erfolgt im Beschäftigtenverhältnis. Die persönlichen Voraussetzungen müssen erfüllt sein. Die Stelle ist zum nächstmöglichen Zeitpunkt zu besetzen und befristet auf 2 Jahre, mit der Möglichkeit der Verlängerung. Es handelt sich um eine Vollzeitstelle. Die Eingruppierung richtet sich nach dem TV-L.

Die RWTH Aachen ist für ihre Bemühungen um die Gleichstellung von Mann und Frau mit dem „Total-Equality-Award“ ausgezeichnet worden. Bewerbungen von Frauen sind ausdrücklich erwünscht. Bei gleicher Eignung, Befähigung und fachlicher Leistung werden Frauen in den Entgeltgruppen bzw. Laufbahnen, in denen eine Unterrepräsentanz von Frauen besteht, bevorzugt berücksichtigt, sofern nicht in der Person eines Mitbewerbers liegende Gründe überwiegen. Auf §8 Abs. 6 Landesgleichstellungsgesetz NW (LGG) wird verwiesen. Die RWTH Aachen ist für ihre Bemühungen um die Ausbildung und Beschäftigung schwerbehinderter Menschen mit dem „Prädikat behindertenfreundlich“ ausgezeichnet worden. Bewerbungen geeigneter schwerbehinderter Menschen sind ausdrücklich erwünscht. Dies gilt auch für Gleichgestellte im Sinne von §2 SGB IX.

**Ihr/e Ansprechpartner/in:**

Frau Dr. Monika Reiss

Tel.: +49 (0) 2418024177 · E-Mail: [m.reiss@biotec.rwth-aachen.de](mailto:m.reiss@biotec.rwth-aachen.de)

oder

Herr Prof. Dr. Schwaneberg

Tel.: +49 (0) 2418024170 · E-Mail: [u.schwaneberg@biotec.rwth-aachen.de](mailto:u.schwaneberg@biotec.rwth-aachen.de)

[www.schwaneberg.com](http://www.schwaneberg.com)

**Ihre Bewerbung richten Sie an:**

Dr. Monika Reiss · Lehrstuhl für Biotechnologie  
RWTH Aachen, Worringer Weg 1, 52074 Aachen

oder per E-Mail an

Dr. Monika Reiss · [m.reiss@biotec.rwth-aachen.de](mailto:m.reiss@biotec.rwth-aachen.de)

Eine Bewerbung per E-Mail ist datenschutzmäßig bedenklich. Der Versender trägt dafür die volle Verantwortung. Es wird eine Bewerbung auf dem Briefpostweg empfohlen.

[www.promega.com](http://www.promega.com) - doing business on research time...

Promega zählt zu den fünf großen weltweit tätigen Life Science Research Unternehmen. Die Promega GmbH aus Mannheim ist mit mehr als 50 Mitarbeitern für den Vertrieb der Produkte des Promega-Konzerns in Deutschland, Österreich und Osteuropa zuständig.

Dank unserer Innovationskraft, hohen Qualitätsstandards und des umfassenden Servicekonzepts werden wir auch in den kommenden Jahren unsere führende Stellung im Markt weiter ausbauen.

**Zum Aufbau eines schlagkräftigen Verkaufsteams für den Pharma- und Biotechnologiemarkt suchen wir ab sofort eine/einen (m/w)**

## Sales Spezialist/in Pharma & Biotechnologie Nord (Vollzeit)

mit Wohnsitz bevorzugt nahe Berlin.

**Hauptaufgaben** sind die wissenschaftlich und kaufmännische Beratung unseres bestehenden Kundenstammes aus Pharma- und Biotechnologie, die Neukundengewinnung sowie der Ausbau und die Ausweitung von Kundenbeziehungen, die Planung und Durchführung von Business Reviews, Produktseminaren und wissenschaftlichen Vorträgen sowie die Marktbeobachtung.

**Erforderlich sind ein abgeschlossenes Studium der Naturwissenschaften (Dipl./Promotion)** und sehr gute praktische Kenntnisse im Bereich Zell- und/oder Molekularbiologie oder verwandter Disziplinen. **Sie haben mindestens zwei Jahre Vertriebs Erfahrung im Life Science-Markt**, bevorzugt mit Marktkenntnissen und Expertise bei Pharma- und Biotechnologie-Kunden. Englisch beherrschen Sie in Wort und Schrift, ebenso die gängigen Office Anwendungen. Sie sind kundenorientiert und reisen sehr gerne (60%-80% Reisetätigkeit).

**Erforderliche persönliche Qualifikationen** sind Begeisterungsfähigkeit, ein hohes Maß an Leistungsbereitschaft und Eigeninitiative in Verbindung mit der Fähigkeit zur Teamarbeit. Verhandlungskompetenz sowie ein sicherer, professioneller Umgang mit Kunden sind ein Muss. Außerdem sehr gute Kommunikations- und Präsentationsfähigkeiten.

Wir bieten leistungsgerechte Bezahlung und persönlichen Freiraum und sichern Sie zusätzlich durch Altersversorgung/Direktversicherung, Unfallversicherung und VWL ab. Darüber hinaus bieten wir Ihnen sehr gute Entwicklungschancen und führen ein kontinuierliches Programm zur Entwicklung Ihrer fachlichen und persönlichen Fähigkeiten durch.

Bitte senden Sie Ihre aussagefähigen Bewerbungs-

unterlagen, die Ihre fachlichen und sozialen

Kompetenzen beschreiben, an Dr. Beate Schnell,

Promega GmbH, Schildkrötstr.15, 68199 Mannheim,

[beate.schnell@promega.com](mailto:beate.schnell@promega.com), Tel: 01 73/6 99 38 98.



**Promega**



## Deutsches Diabetes-Zentrum

an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf  
Leibniz-Zentrum für Diabetes-Forschung  
Träger: Deutsche Diabetes-Forschungsgesellschaft e.V.

Das Deutsche Diabetes-Zentrum ist eine vom Bund und vom Land Nordrhein-Westfalen institutionell geförderte Forschungseinrichtung an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, deren Auftrag es ist, auf Basis interdisziplinärer Forschung Beiträge zur Reduzierung der individuellen und gesellschaftlichen Belastung durch den Diabetes mellitus zu leisten.

Das Institut für Klinische Diabetologie (Direktor: Prof. Dr. M. Roden) des Deutschen Diabetes-Zentrums sucht zum nächstmöglichen Zeitpunkt, zunächst befristet bis 31.12.2011 (ggf. auch für die Dauer von 2 Jahren), insgesamt drei

### Naturwissenschaftler/innen und/oder Mediziner/innen (Postdoc oder Doktorand/in)

Im Zentrum der Tätigkeiten stehen die Untersuchungen des zellulären Energiestoffwechsels in experimentellen und klinisch experimentellen Studien.

Besondere Erfahrungen in Signaltransduktion sowie Organellenfunktion und -biologie (z. B. Mitochondrien) sind wünschenswert. Begeisterungsfähigkeit und überdurchschnittliches Engagement werden erwartet. Die Möglichkeit zur Habilitation ist gegeben.

Das Arbeitsverhältnis einschließlich der Vergütung richtet sich nach dem Tarifvertrag für den öffentlichen Dienst der Länder (TV-L Wissenschaft) in der für das Land Nordrhein-Westfalen geltenden Fassung.

Die Beachtung der Schwerbehindertenrichtlinien und der Vorschriften des Gesetzes über Teilzeitarbeit ist gewährleistet. Wir fördern die berufliche Gleichstellung von Frauen und Männern. Das Arbeitsverhältnis einschließlich der Vergütung richtet sich nach dem Tarifvertrag für den öffentlichen Dienst der Länder (TV-L Wissenschaft) in der für das Land Nordrhein-Westfalen geltenden Fassung.

Ihre Bewerbung mit Lebenslauf, wiss. Werdegang und Verzeichnis der Veröffentlichungen richten Sie bitte bis zum 28.02.2010 an die Trägergesellschaft:

**Deutsche Diabetes-Forschungsgesellschaft e.V.**  
**- Personalwirtschaft - D-40225 Düsseldorf, Auf'm Hennekamp 65**

[www.ddz.uni-duesseldorf.de](http://www.ddz.uni-duesseldorf.de)



## Forschungszentrum Borstel

Am Forschungszentrum Borstel Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften ist in der Arbeitsgruppe Molekulare Mykobakteriologie ab März 2010 eine Stelle als

### Wissenschaftliche/r Mitarbeiter/in (Postdoc)

zu besetzen.

Die Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit der molekularen Epidemiologie des Tuberkulose-Erregers, der Aufklärung von Resistenzmechanismen gegenüber Antituberkulotika sowie der genetischen Diversität und deren Bedeutung für die Wirt-Pathogen-Interaktion. Neben klassischen Analyse-Methoden werden z. B. Hochdurchsatz-Sequenziertechnologien, sowie vergleichende Transkriptom- und Proteomanalysen angewandt.

Es werden Bewerber/innen mit einem naturwissenschaftlichen Diplom- oder Master Examen sowie abgeschlossener Promotion gesucht. Voraussetzung für eine erfolgreiche Bewerbung sind fundierte molekularbiologische Kenntnisse (PCR-Techniken, Klonierung, Sequenzierung) sowie Erfahrung mit S2- oder S3-Pathogenen (bevorzugt Mykobakterien). Darüber hinaus sind bioinformatische Fähigkeiten, z. B. in der Genomsequenz- oder Microarray-Analytik, wünschenswert.

Die Stelle ist zunächst für ein Jahr befristet, es besteht jedoch die Möglichkeit der Verlängerung. Die Vergütung erfolgt nach dem TVöD (VKA). Es werden alle im öffentlichen Dienst üblichen Sozialleistungen geboten. Schwerbehinderte werden bei sonst gleicher Eignung bevorzugt eingestellt. Das FZB ist bestrebt, den Anteil der Frauen in herausgehobenen Positionen zu erhöhen und fordert deshalb entsprechend qualifizierte Frauen nachdrücklich auf, sich zu bewerben.

Weitere Informationen finden sich unter [www.fz-borstel.de](http://www.fz-borstel.de).  
Auskünfte erteilt auch PD Dr. Stefan Niemann  
unter [sniemann@fz-borstel.de](mailto:sniemann@fz-borstel.de).

Ihre aussagekräftige Bewerbung (gerne auch per Email)  
senden Sie bitte an das

**Personalwesen des Forschungszentrums Borstel**  
Stichwort: PostdocMoiMyk  
Parkallee 2, 23845 Borstel  
E-Mail: [personalwesen@fz-borstel.de](mailto:personalwesen@fz-borstel.de)

A PhD student position is available in the Institute of Molecular & Cell Physiology at Hannover Medical School (MHH).



Medizinische Hochschule  
Hannover

### PhD Position to Study Molecular Motors (E13/2)

As part of a DFG-funded Research Group our research team focuses on the mechano-chemical properties of motor enzymes by investigating these properties at the level of individual motors (e.g., optical trap and TIRF microscopy). The project in question will focus on molecular engineering of motor proteins and the use of these motors in single molecule assays. It is one of our goals to control motor properties and employ them in nano-devices.

Requirements for the position are an University degree in Biochemistry, Molecular Biology, or Biophysics as well as lab experience in molecular biology and protein biochemistry. Interest in biophysical methods would be advantageous.

Applicants should send their CV and a brief outline of their research experience and interests to

**Medical School of Hannover – Department of Molecular- und Cellphysiology**  
PD Dr. Walter Steffen (Mail: [Steffen.WalterMH-Hannover.de](mailto:Steffen.WalterMH-Hannover.de))  
OE 4210 | Carl-Neuberg-Str. 1 | 30625 Hannover, Germany



## **MANAGING DIRECTOR CAMPUS SUPPORT FACILITY**

The Campus Vienna Biocenter (CVBC) is a thriving life science campus in the heart of Europe. Currently 4 basic research institutes and 6 companies with 1800 employees and students from 40 different nations are located at the CVBC. In order to implement new joint scientific infrastructure facilities at the CVBC, a new legal entity – the Campus Support Facility (CSF) - will be set up. The new organization will be headed by a managing director who will guide the future development of this technology platform. He/she will oversee a team of about 60 highly qualified experts and direct investments in state of the art equipment like deep sequencing, mouse phenotyping, imaging, etc.

### **Qualifications**

- University degree in a relevant domain (e.g. biology, medicine, biotechnology)
- University degree in a business education and management or adequate work experience
- Experience of at least 3 years in a leadership position ideally in the life sciences field including responsibility for investments and overall budget
- Profound knowledge in accounting, financing and budgeting
- Excellent communication, interpersonal and negotiating skills; Leadership qualities and ability to work autonomously
- Previous experience in coordinating and running core facilities will be considered a plus
- Fluent command of English, preferably also German

### **Key responsibilities**

- Development of business plans (3 to 5 year plans) for the set-up and further development of the Campus Support Facility
- Directing the implementation of the new facilities; recruiting staff and coordinating the purchasing of equipment
- Proposal of new technologies and development of services based on user requirements and market developments
- Administration and organization of all core facilities
- Proposal of annual headcount, investment and cost budgets for each facility
- Development of a detailed cost accounting system to secure a fair and transparent user fees system and to meet the documentation requirements of funding agencies
- Acquisition of external customers (non CVBC members) to exploit spare capacities

Please send your CV and application to: **[office@viennabiocenter.org](mailto:office@viennabiocenter.org)**

For further details contact Harald Isemann. Tel:+43 1 79730 Ext.3601



# Max-Planck-Institut für molekulare Genetik

Das Max-Planck-Institut für molekulare Genetik ist ein internationales Forschungsinstitut im Bereich der medizinischen Genomforschung. Es ist der Untersuchung von Struktur und Funktion des Genoms des Menschen und anderer Organismen gewidmet und beschäftigt etwa 470 Mitarbeiter/innen.

In der Arbeitsgruppe "Development and Disease" (Prof. Dr. Stefan Mundlos) am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik / Institut für Medizinische Genetik, Charité – Universitätsmedizin Berlin ist ab sofort für die Dauer von 3 Jahren folgende Stelle zu besetzen:

## Doktorand/in

Kennz. M 01/02 (50% Entgeltgruppe 13 TVöD)

### Aufgabengebiet:

Die Arbeitsgruppe befasst sich mit der molekularen und genetischen Analyse der Funktion von Neurofibromin in der Knochenentwicklung und Knochenheilung. Neurofibromatose Typ 1 (NF1) ist eine häufig auftretende genetische Erkrankung, welche sich durch skelettale Fehlbildungen und eine gestörte Knochenfrakturheilung auszeichnet. Das Ziel des Projektes ist es, die Funktion von NF1 in der Regeneration von Knochenverletzungen zu verstehen und in diesem Zusammenhang neue therapeutische Strategien zu entwickeln. Neben angewandter Mausgenetik kommen molekulare, histologische und morphometrische Methoden zum Einsatz.

Bitte senden Sie Ihre Bewerbung bis zum 26.02.2010 an das

### Max-Planck-Institut für molekulare Genetik

Personalabteilung – M 01/02

lnhstr. 63 – 73 | 14195 Berlin

oder per E-Mail an: job-0102@molgen.mpg.de

### Voraussetzungen:

Wir suchen ein hoch motiviertes und engagiertes Mitglied für unser Team. Bewerber/innen sollten über ein Diplom- oder Masterabschluss auf biomedizinischem Gebiet (Biologie, Biochemie, Biotechnologie oder vergleichbarer Disziplin) und über Interesse an molekularbiologischen und biochemischen Fragestellungen verfügen. Erfahrungen auf dem Gebiet der Entwicklungsbiologie sowie im Umgang mit Tiermodellen sind von Vorteil.

Die Max-Planck-Gesellschaft ist bemüht, mehr schwerbehinderte Menschen zu beschäftigen. Bewerbungen Schwerbehinderter sind ausdrücklich erwünscht.

Die Max-Planck-Gesellschaft strebt eine Erhöhung des Frauenanteils an. Deshalb sind Bewerbungen von Frauen ausdrücklich erwünscht.

CONRATH



The company is a privately financed, global acting leader in the biotechnology fields specialized in supporting stem cell research. The company is located in North America, with subsidiaries in Europe, Asia and Australia in clusters for life sciences research. Customers are scientific researchers mainly in haematology/immunology and tissue engineering labs at key universities or privately owned big centres.

CONSULTING & COACHING For further internationalization the client is looking for an

## Account Manager Stem Cell Research for the Netherlands (m/f)

This is either an interesting task for an experienced sales professional or for a young professional with a profound corresponding scientific background and first sales experience.

### The Position

- To manage and to support all existing customers and to realize the direct marketing and sales targets in the Netherlands and Dutch speaking parts of Belgium
- To systematically introduce new products into the market including pricing
- To completely support all customers scientifically including organization of trainings, seminars, workshops and on-site visits in customer labs
- The future job holder will work from home office and will report to the Sales Director Germany

### Your Profile

- MSc., university degree in life science, preferably with specialization in cell biology
- Sound experience within the sectors of cell culture or cell separation
- First experiences in sales/marketing
- Dutch and English fluent, candidates with additional German language skills are preferred

### Contact

Please submit your structured CV with photo and references and a cover letter to Conrath Consulting & Coaching via E-mail: conrath@conrathcc.com  
www.conrathcc.com  
Phone: +49 (211) 75844840.

# Kontakt zu Verbänden

Die Mitglieder der nachfolgenden Fachgesellschaften erhalten LABORWELT regelmäßig mit freundlicher Empfehlung ihrer Organisationen. Wer sich darüber hinaus für eine Mitarbeit oder einen Beitritt interessiert, erreicht die Fachgesellschaften unter den folgenden Kontaktdaten:

Ich interessiere mich für

- den Beitritt  
 Unterstützung für Jungwissenschaftler  
 Interessenvertretung  
 eine Spende  
 Fachgruppen im Bereich

Bitte kontaktieren Sie mich

Verband (siehe unten, bitte ankreuzen)

Name

Firma

Tel.

Fax

E-Mail

## Dt. Ver. Gesell. f. Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V. (DGKL)



Geschäftsstelle der DGKL  
 Im Mühlenbach 52 b  
 53127 Bonn  
 Tel.: +49-(0)-228-92-68-9522  
 Fax: +49-(0)-228-92-68-9522  
 geschaeftsstelle@dgkl.de  
 www.dgkl.de

## Gesellschaft für Genetik



c/o HZM – Deutsches  
 Forschungszentrum für  
 Gesundheit/Inst. of Develop-  
 mental Genetics  
 Tel.: +49-(0)-89-3187-2610  
 Fax: +49-(0)-89-4620  
 www.gfgenetik.de

## Netzwerk Nutrigenomik



Netzwerk Nutrigenomik  
 Arthur-Scheunert-Allee 114  
 14558 Nuthetal  
 Tel.: +49-(0)-33200-88-301  
 Fax: +49-(0)-33200-88-541  
 mail@nutrigenomik.de  
 www.nutrigenomik.de

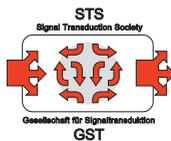
## Deutsche Gesellschaft für Proteomforschung



Deutsche Gesellschaft für  
 Proteomforschung e.V.

c/o MPI für Biochemie  
 Am Klopferspitz 18a  
 82152 Martinsried  
 Tel.: +49-(0)-89-1897-9007  
 Fax: +49-(0)-89-1897-9009  
 c.kleinhammer@dgpf.org  
 www.dgpf.org

## Gesellschaft für Signaltransduktion



c/o Prof. Dr. Ralf Hass  
 Med. Hochschule Hannover  
 AG Biochemie u. Tumoriol.  
 30625 Hannover  
 Tel.: +49-(0)-511-532-6070  
 Fax: +49-(0)-511-532-6071  
 www.sigtrans.de

## RNA-Netzwerk



c/o Prof. Dr. Volker A. Erdmann  
 Freie Universität Berlin  
 Thielallee 63, 14195 Berlin  
 Tel.: +49-(0)-30-8385 6002  
 Fax: +49-(0)-30-8385 6413  
 erdmann@chemie.fu-berlin.de  
 www.rna-network.com

## BIO Deutschland

BIO DEUTSCHLAND

Tegeler Weg 33/  
 berlinbiotechpark  
 10589 Berlin  
 Tel.: +49-(0)-30-3450593-30  
 Fax: +49-(0)-30-3450593-59  
 info@biodeutschland.org  
 www.biodeutschland.org

## Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie



Geschäftsstelle der DGPT  
 Achenbachstraße 43  
 40237 Düsseldorf  
 Tel.: +49-(0)-211-600-692-77  
 Fax: +49-(0)-211-600-692-78  
 mitglieder@dgpt-online.de  
 www.dgpt-online.de

## FA Life Science Research im VdGH



c/o VdGH im VCI  
 Mainzer Landstraße 55  
 60329 Frankfurt am Main  
 Tel.: +49-(0)-69-2556-1730  
 Fax: +49-(0)-69-236650  
 vdgh@vdgh.de  
 www.vdgh.de

## Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM)



c/o Institut für Hygiene und  
 Med. Mikrobiologie  
 Carl-Neuberg-Straße 1  
 30625 Hannover  
 Tel.: +49-(0)-511-532-4655  
 Fax: +49-(0)-511-532-4355  
 www.dghm.org

## Nationales Genomforschungsnetz



c/o DKFZ  
 Im Neuenheimer Feld 580  
 69120 Heidelberg  
 Tel.: +49-(0)-6221-424-743  
 Fax: +49-(0)-6221-423-454  
 S.Argo@dkfz-heidelberg.de  
 www.ngfn.de

## Österreichische Reinraumgesellschaft (ÖRRG)



ÖRRG  
 Neudorf 41  
 A-8262 Ilz  
 Tel.: +43-(0)-3385-8117  
 Fax: +43-(0)-3385-8117  
 office@oerrg.at  
 www.oerrg.at

## bts (Biotechnologische Studenteninitiative e.V.)



c/o BIOCUM  
 Stralsunder Straße 58–59  
 13355 Berlin  
 Tel.: +49-(0)-2649-21-21  
 Fax: +49-(0)-2649-21-11  
 www.bts-ev.de

## Deutsche Gesellschaft für Neurogenetik



Institut für Humangenetik  
 Calwer Straße 7  
 72076 Tübingen  
 Tel.: +49-(0)-7071-2977692  
 Fax: +49-(0)-7071-295171  
 peter.bauer@  
 med.uni-tuebingen.de  
 www.hih-tuebingen.de/dgng/

## Österreichische Ges. f. Laboratoriumsmedizin & Klinische Chemie

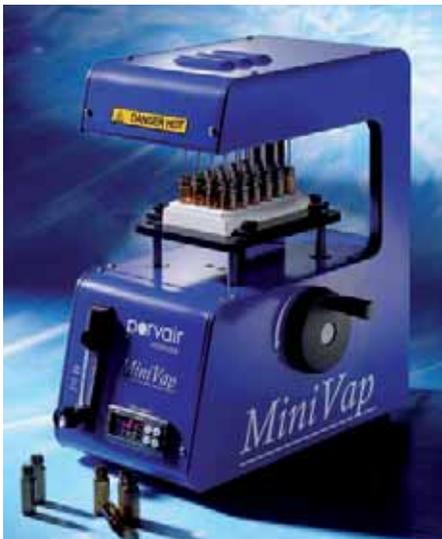


ÖGLMKC Geschäftsstelle  
 Infomedica-KEG, Xenius Behal  
 Tullnertalgasse 72  
 A-1230 Wien  
 Tel./Fax: +43-(0)-1889-6238  
 office@oeglmkc.at  
 www.oeglmkc.at

Porvair

## Günstiger Verdampfer

Der neue MiniVap™ von Porvair Sciences Ltd. mit 24 Positionen wurde eigens entwickelt, damit Forscher Flüssigkeiten vor der Analyse oder der Puffer-Rekonstitution effizienter aus Röhren, Schläuchen und Vertiefungen von Mikrottestplatten entnehmen können. Der kompakte und preisgünstige MiniVap wurde für Forschungs- und Entwicklungslabors konzipiert, die kleinere Mengen an Röhren und Ampullen (mit einem Volumen von bis zu 3 ml) sowie Mikrottestplatten mit 24 Vertiefungen nutzen. Durch das simultane Einspritzen von erhitztem Stickstoff, der direkt in die Röhren, Ampullen oder Vertiefungen eingebracht wird, ermöglicht der MiniVap™ sehr kurze Trocknungszeiten. Der



Verdampfer überzeugt durch eine einfache Einrichtung, Nutzung und Wartung. Zur Installation werden lediglich ein Gasanschluss und eine herkömmliche Netzbuchse benötigt, an die der Verdampfer angeschlossen wird. Die Betriebssicherheit des CE-geprüften kompakten Geräts ist ebenfalls gewährleistet, da das Gerät in alle Dunstabzüge passt.

Porvair Sciences Ltd. hat sich seit seiner Gründung im Jahr 1992 auf die Herstellung von Mikrottestplatten spezialisiert und konzentriert sich auf die wissenschaftlichen Bereiche Life Sciences, Medikamentenforschung, Festphasenextraktion, Proteinreinigung, Screening-Anwendungen sowie Proteomik und Genomik. Porvair Sciences ist ein 100%-iges Tochterunternehmen von Porvair plc.

**Porvair Sciences Ltd.**  
Unit 6, Shepperton Business Park  
Govett Avenue  
Shepperton, Middlesex, TW17 8BA, UK  
Tel.: +44-(0)1372-824290  
int.sales@porvair-sciences.com  
www.porvair-sciences.com

Sartorius

## Sartorius erhält „iF product design awards 2010“

Gleich für zwei ihrer Produkte hat die Sartorius AG den internationalen „iF product design award 2010“ erhalten. Ausgezeichnet wurden in der Kategorie Medicine/Healthcare Ende des Jahres die Premium-Laborwaage „Cubis“ und das Reinstwassersystem „arium pro“ (vgl. Foto). Die neuen Produkte des Prozess- und Laborspezialisten überzeugten die 24-köpfige Fachjury hinsichtlich aller elf Kriterien wie Gestaltungsqualität, Innovationsgrad und Umweltverträglichkeit. Der „iF product design award“ zählt zu den renommiertesten Designwettbewerben weltweit und wurde zum 56. Mal verliehen. Insgesamt hatte die Jury knapp 2.500 Einreichungen aus 39 Nationen zu bewerten. Die Teilnehmer traten in 16 Kategorien gegeneinander an.

Mit der neuen Laborwaage Cubis hat Sartorius Anfang 2009 eine Premium-Waagenreihe auf den Markt gebracht, die modular aufgebaut und frei konfigurierbar ist und an wechselnde Arbeitsbereiche angepasst werden kann. Mit einem neu entwickelten Bedienkonzept erfüllt sie moderne Wägenanforderungen – vom einfachen Wägen von Substanzen bis zur Verwaltung komplexer Abläufe.

Das Wasseraufbereitungssystem arium pro ist ein Gerät, das reinstes Wasser für den

Einsatz jeglicher Laboranalysen, wie etwa die Ionenchromatographie, Zellkultivierung oder Protein-Aufreinigung produziert.



**Elke Schild**  
Sartorius AG  
37070 Göttingen;  
Tel.: +49-(0)551-308-3684  
Fax: +49-(0)551-308-3572  
elke.schild@sartorius.com  
www.sartorius.com

Millipore

## Neu: automatischer Zellzähler im Pipetten-Format

Millipore hat das erste automatische Zellzählgerät im Pipetten-Format vorgestellt – den Scepter™-Zellzähler. Das Gerät miniaturisiert die in weitaus größeren Geräten eingesetzte Coulter-Zellzähltechnologie in einem tragbaren



Gerät, das so groß ist wie eine automatische Pipette und über eine technisch ausgereifte Elektronik für die Zellerkennung, Signalverarbeitung und Datenspeicherung verfügt. Die Zellzahl und das durchschnittliche Zellvolumen werden binnen 20 Sekunden nach Eintauchen der Spitze in eine Zellkulturprobe auf einem Grafik-Display angezeigt. Die Technologie ist eine Alternative zur geläufigen manuellen Zählung mittels eines Hämozytometers unter dem Mikroskop und zu wesentlich teureren, nicht tragbaren automatischen Zellzählern. Neben der Zellzahl und dem durchschnittlichen Zellvolumen wird auch die Zellverteilung nach Volumen und Durchmesser in einem Histogramm dargestellt, das Einblick in den Zustand der Kultur gibt. Die Ergebnisse können im Gerät gespeichert oder auf einen Computer heruntergeladen werden. Der Scepter-Zellzähler wird in der zweiten Hälfte des ersten Quartals 2010 erhältlich sein.

**Millipore**  
Ulrike Baer-Chardot, PhD  
Millipore Bioscience Division, B.P. 307  
F-78054 St Quentin Yvelines Cedex  
Tel.: +33-(0)1-3012-7037  
ulrike\_baer-chardot@millipore.com  
www.millipore.com

Februar 2010-April 2010

# Veranstaltungskalender

22.-23.02.10

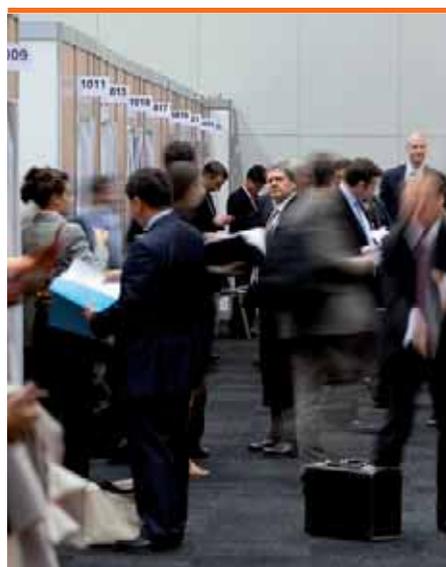
## 2<sup>nd</sup> International Conference on Sustainable Pharmacy – Incentives and Perspectives, Osnabrück

Info: Dr. Maximilian Hempel, Deutsche Bundesstiftung Umwelt (Tel.: +49-541-9633-916, E-Mail: n.weichselfelder@dbu.de, Web: www.dbu.de)

23.-24.02.10

## PDA European Conference on Pharmaceutical Microbiology, Berlin

Info: Parenteral Drug Association PDA (Web: www.pda.org)



08.-10. März 2010, Barcelona

## BioEurope Spring: Partnern

Das wichtigste Partnering-Treffen für Biotechnologie-Unternehmen dieses Frühjahres veranstaltet die EBD-Group in Barcelona. Wer Kontakte pflegen und schließen will, tut gut daran, schon jetzt den elektronischen Informationsaustausch zu starten: [www.ebdgroup.com/bes/index.htm](http://www.ebdgroup.com/bes/index.htm)

24.-25.02.10

## Antibody Engineering and Design – Acceleration Progress in Antibody Drug Development, Frankfurt am Main

Info: Hanson Wade Ltd. (Tel.: +44-203-141-8700, Web: www.biorbis.com)

24.-25.02.10

## Science to Market, Wien

Info: Dr. Marion Kronabel, EAPB (E-Mail: marion.kronabel@eapb.org, Web: www.eapb.org)



20. April 2010, München

## BioVaria 2010: Lizenzen & Co

Nach dem großen Erfolg der Auftaktveranstaltung 2008 werden potentiellen Lizenznehmern aus der Industrie in diesem Jahr noch mehr biopharmazeutische Projekte auf der BioVaria präsentiert. Tech-Transfer-Organisationen aus ganz Europa sind bereits angemeldet: [www.biovaria.org](http://www.biovaria.org).

25.-28.02.10

## EDDP 2010 – International Conference on Early Disease Detection and Prevention, München

Info: Paragon Conventions (E-Mail: eddp2010@paragon-conventions.com, Web: [www.paragon-conventions.com/eddp2010](http://www.paragon-conventions.com/eddp2010))

01.03-02.03.10

## EuroPLX42 – European Pharma License Exchange, Valetta (MT)

Info: Dr. Norbert Rau, RauCon (E-Mail: [meetyou@europlx.com](mailto:meetyou@europlx.com), Web: [www.europlx.com](http://www.europlx.com))

03.03-05.03.10

## EMBL Workshop on Visualizing Biological Data (VizBi), Heidelberg

Info: EMBL (E-Mail: [conferences@embl.de](mailto:conferences@embl.de), Web: [www-db.embl.de/jss/EmblGroupsOrg/conf\\_128](http://www-db.embl.de/jss/EmblGroupsOrg/conf_128))

04.-06.03.10

## European Course for Life Sciences Executives, ECLE, Bad Schauenburg (CH)

Info: Dr. Nicole Gilgen, ECLE Executive Office, c/o ECPM (E-Mail: [nicole.gilgen@unibas.ch](mailto:nicole.gilgen@unibas.ch), Web: [www.ecpm.ch/ecl](http://www.ecpm.ch/ecl))

08.03-11.03.10:

## World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Valetta (MT)

Info: AG für Pharmazeutische Verfahrenstechnik (APV) (Web: [www.worldmeeting.org](http://www.worldmeeting.org))

08.-10.03.10

## 22<sup>nd</sup> DIA-EuroMeeting, Monaco (MC)

Info: DIA Drug Information Association (Tel.: +41-61-225-5151, E-Mail: [diaeurope@diaeurope.org](mailto:diaeurope@diaeurope.org), Web: [www.diahome.org](http://www.diahome.org))

9.3-10.03.10

## Barrier Systems and Current Aseptic Technologies, Düsseldorf

Info: European Compliance Academy (E-Mail: [support@gmp-compliance.org](mailto:support@gmp-compliance.org), Web: [www.pharma-kongress.com](http://www.pharma-kongress.com))

09.03.10

## CONTACT 2010, Heidelberg

Info: Anne-Susan Gantzert, BioContact e.V. – DKFZ (Fax: +49-611-5055927, E-Mail: [a.gantzert@bio-contact.info](mailto:a.gantzert@bio-contact.info), Web: [www.contact2010.info](http://www.contact2010.info))

10.-12.03.10

## 1<sup>st</sup> International Metabolomics Symposium – Metabolomics & More – The Impact of Metabolomics on the Life Sciences, Freising-Weißenstephan

Info: Christine Röger, ZIEL-TUM-Akademie (Tel.: +49-8161-712832, E-Mail: [christine.roeger@wzw.tum.de](mailto:christine.roeger@wzw.tum.de), Web: [www.metabolomics-and-more.de](http://www.metabolomics-and-more.de))

17.-18.03.10:

## Biomedica 2010, Aachen

Info: LifetecZONE/BioLiège/LifeTech Limburg/LifeTec Aachen-Jülich e.V. (E-Mail: [info@biomedica.com](mailto:info@biomedica.com), Web: [www.biomedica2010.com](http://www.biomedica2010.com))



27.-29. April 2010, Nürnberg

## TechnoPharm zeigt Neues

Die einzige für die Pharma- und Life Sciences-Branche relevante europäische Fachmesse für Steriltechnik, Analytik und Verpackungstechnik informiert Ende April über die neuesten Produkte und Entwicklungen: [www.technopharm.de](http://www.technopharm.de)

# Neue Zentren verändern Karrierewege

Thomas Gabrielczyk

Es gibt auch noch gute Nachrichten inmitten der Krise und in Zeiten des Rotstiftes, der besonders brutal an Deutschlands Hochschulen regiert. Mit zwei neuen Technologiezentren in Bochum und Marburg entstehen zahlreiche Jobs für Bio- und Nachwuchswissenschaftler. Gut 21 Mio. Euro – exklusive eines Neubaus – fließen dabei an die Universität Marburg, wo die Max-Planck-Gesellschaft und das Land Hessen in den nächsten fünf Jahren das größte Zentrum für die Synthetische Biologie in Europa aus dem Boden stampfen. Rund 100 neue Stellen, eine Graduiertenschule, vier Nachwuchsgruppen und zwei Professuren entstehen laut Lotte Sørgaard-Andersen, der Wissenschaftlichen Koordinatorin von SYNMIKRO, in den nächsten fünf Jahren am Loewe-Zentrum für Synthetische Mikrobiologie. Noch mehr Geld fließt in die Proteomforschung am Standort Bochum. Dort startete die Landesregierung Nordrhein-Westfalens pünktlich vor den Landtagswahlen mit einer gut 37 Millionen Euro-Förderung das Europäische Proteinforschungsinstitut PURE, das sich der Entwicklung von diagnostischen Krebs-, Alzheimer- und Parkinson-Biomarkern verschrieben hat und in den nächsten fünf Jahren zu einem neuen Fraunhofer-Institut für Proteinanalytik und Biomarkerentwicklung ausgebaut wird.

Die Gründung der Zentren ist vor allem eine gute Nachricht für junge Wissenschaftler. Denn wie in England oder den USA, wo Core-Facilities schon lange Normalität sind, verbreitern die neuen Zentren die Karrieremöglichkeiten für sie und bieten ihnen Alternativen jenseits der klassischen Leitung einer Forschungsgruppe. Denn mit den Jobs ist eine klare Anwendungsorientierung verknüpft. Gefragt sind neben wissenschaftlicher Expertise auch Managementfähigkeiten. Denn beide Zentren sind so angelegt, dass sie sich nach fünf Jahren zu einem guten Teil durch Industrieaufträge co-finanzieren sollen.

## Dienstleistungszentrum für Pharma- und Diagnostiksektor

In Bochum entsteht ein Dienstleistungszentrum für die Biomarkerentwicklung, das von der Entdeckung frühdagnostischer Proteinmarker, ihrer Validierung bis zur Entwicklung diagnostischer Prototyp-Kits und deren Auslizenzierung an Pharma- und Diagnostik-Unternehmen fast die

ganze Biomarker-Wertschöpfungskette abdeckt. Daneben wird die Technologie- und Methodentwicklung, zum Beispiel IR-spektrometrischer Verfahren, großgeschrieben und bis Ende des Jahres der Aufbau eines Studienzentrums und einer Biomaterialbank begonnen. Durch Kooperationen mit der gesetzlichen Unfallversicherung und diversen Zentren rechnen die PURE-Koordinatoren Helmut Meyer, Klaus Gerwert, Thomas Bruening und Jens Wiltfang mit einer Gesamtförderung von rund 100 Mio. Euro bis 2014.

Ziel des Marburger SYNMIKRO-Zentrums ist es, in Industriekooperationen Mikroorganismen mit neuen Eigenschaften zu erzeugen. Dabei setzen die Marburger zunächst auf die Herstellung von Biotreibstoffen und Feinchemikalien. Der Fokus auf die Weiße Biotechnologie geht der Entwicklung innerhalb der Industrie leicht voraus. Binnen der nächsten 20 Jahre planen die Chemieunternehmen, Produktionsnetzwerke aufzubauen, die nachwachsende statt petrochemische Rohstoffe nutzen, um flexibler auf die Preisvolatilität von Erdöl reagieren zu können.

## Inserentenverzeichnis

austria wirtschaftsservice wep fonds ...	13
Beckman Coulter GmbH .....	11
Bio&Sell e.K. ....	25
Deutsche Messe AG .....	15
EBD Group, BioSpring .....	U3
Millipore Corporation .....	U2
Messe München, Analytica 2010 .....	9
Microsynth GmbH .....	7
New England Biolabs GmbH .....	U4
PerkinElmer .....	5
Porvair Science Ltd. ....	25
Promega GmbH .....	46
Startbahn MedEcon Ruhr GmbH .....	21
Steinbrenner Laborsysteme.....	19, 27

## Vorschau Heft 2/2010



### Thema Bioanalytik

Next-Generation-Sequencer, die nur ein Viertel aktueller Geräte kosten und damit Sequencing-Dienstleistern das Geschäft verhaseln, auf Oberflächen wie einem Taschentuch immobilisierte Protein-Diagnostika oder aktuelle Informationen über die neuesten Geräte- und Methodentwicklungen direkt aus dem Labor sowie die neuen Methodentests von Wissenschaftlern für Wissenschaftler – das alles bietet die nächste LABORWELT-Ausgabe mit dem Thema „Bioanalytik“, kurz bevor die große Laborshow Analytica in München beginnt.

### Marktübersicht: miRNA quantifizieren

Werbekunden bietet diese Ausgabe eine optimale Plattform für ihre Produkt- und Imageanzeigen. Reservieren Sie Ihren Werbeplatz in der LABORWELT-Themenausgabe bis spätestens zum 05. März 2010. Ergänzend zu dem Themenschwerpunkt Bioanalytik veröffentlichen wir eine Marktübersicht „miRNA-Quantifizierung“, in der die Anbieter Array-, Sequencing- und qPCR-basierter Nachweissysteme die Vorzüge ihrer Technologie darstellen können. Informationen zu Ihrer möglichen Teilnahme gibt Oliver Schnell (Tel.: +49-30-264921-45, E-Mail: o.schnell@biocom.de).

## Impressum

**LABORWELT** (ISSN 1611-0854)  
erscheint zweimonatlich im

**BIOCOM Verlag GmbH**  
Stralsunder Straße 58–59  
13355 Berlin, Germany  
Tel./Fax: 030/264921-0 / 030/264921-11  
laborwelt@biocom.de  
www.biocom.de

**Redaktion**  
Dipl.-Biol. Thomas Gabrielczyk  
Tel.: 030/264921-50

**Anzeigenleitung**  
Oliver Schnell  
Tel. 030/264921-45,  
o.schnell@biocom.de

**Leserservice**  
Angelika Werner, Tel. 030/264921-40

**Graphik-Design**  
Michaela Reblin

**Druck:**  
Druckhaus Hamburg GmbH, 28325 Bremen

Für einen regelmäßigen Bezug von LABORWELT ist eine kostenlose Registrierung unter [www.biocom.de](http://www.biocom.de) oder per Fax erforderlich.

Namentlich gekennzeichnete Beiträge stehen in der inhaltlichen Verantwortung der Autoren. Alle Beiträge sind urheberrechtlich geschützt. Ohne schriftliche Genehmigung des BIOCOM Verlages darf kein Teil in irgendeiner Form reproduziert oder mit elektronischen Systemen verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

© BIOCOM Verlag GmbH, Berlin

 **www.laborwelt.de**

**BIOCOM**

WHERE THE GLOBAL BIOTECH INDUSTRY COMES TO PARTNER

4<sup>th</sup> ANNUAL INTERNATIONAL PARTNERING CONFERENCE

# BIO-EUROPE SPRING<sup>®</sup> 2010

Join the pre-conference  
partnering process!

**MARCH 8–10, 2010**  
**BARCELONA, SPAIN**

**CENTRE CONVENCIONES INTERNACIONAL BARCELONA (CCIB)**

BIO-Europe Spring<sup>®</sup> is the springtime counterpart to EBD Group's flagship conference, BIO-Europe, and continues the tradition of providing life science companies with high caliber partnering opportunities. The event enables delegates to identify, meet and network with companies across the life science value chain from large biotech and pharma companies to financiers and innovative start-ups. In addition to productive partnering, the conference offers high level workshops, panels, company presentations and a lively exhibition.

For further information, please view our conference website  
at [www.ebdgroup.com/bes](http://www.ebdgroup.com/bes)

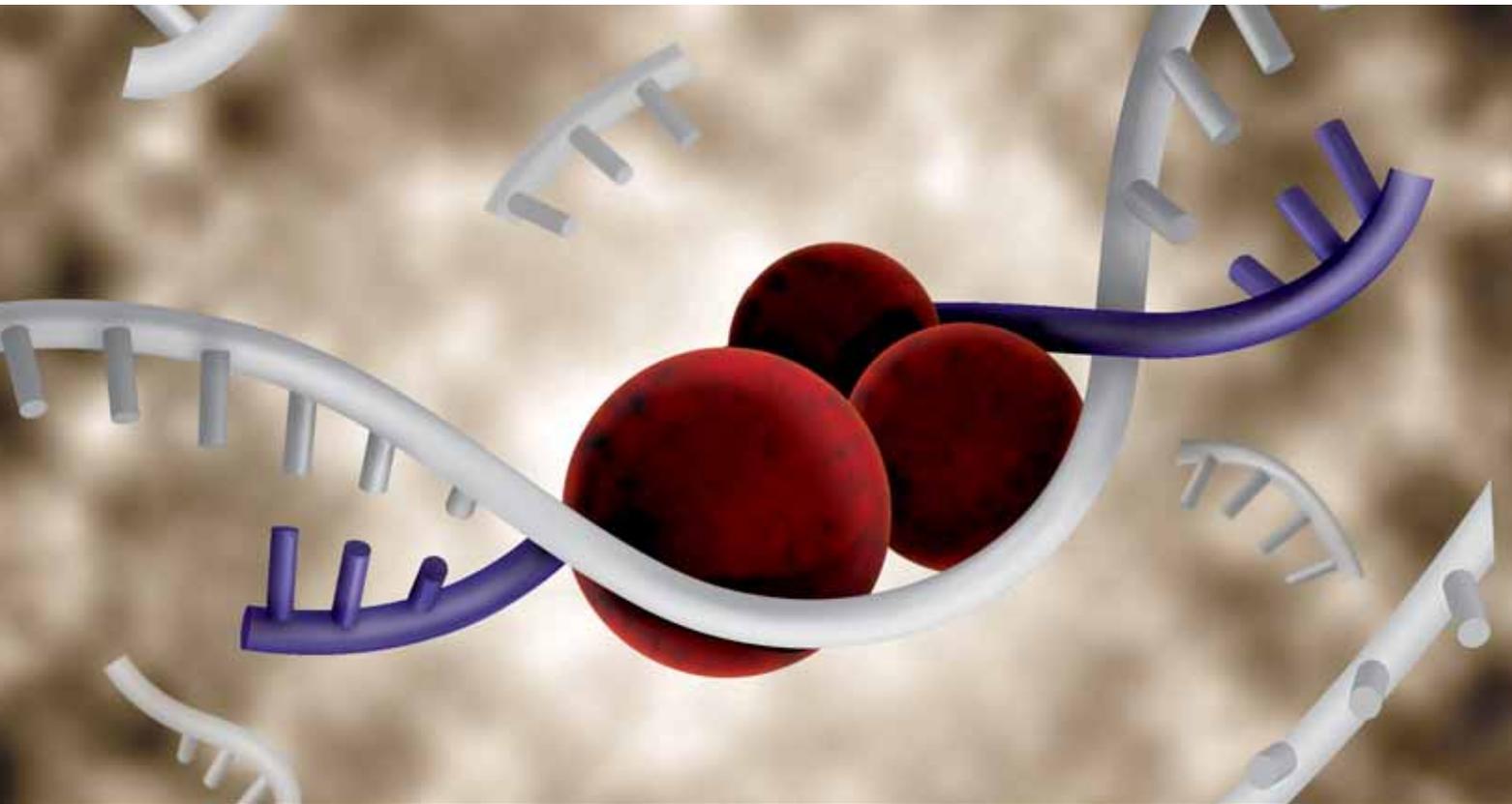
Producer

**EBD**  
GROUP

Supported by

**Bio**  
BIOTECHNOLOGY  
INDUSTRY ORGANIZATION

**biocat**  
The Biotech  
Industry of Catalonia



# SignalSilence<sup>®</sup> siRNA

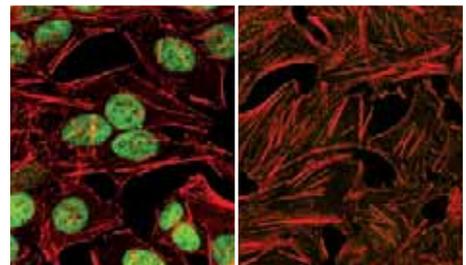
duplexes from Cell Signaling Technology<sup>®</sup>

SignalSilence<sup>®</sup> siRNA duplexes allow the researcher to specifically inhibit protein expression. Two equally potent siRNAs are available for each target (siRNA I and II). A fluorescein-labeled non-targeted siRNA control allows the user to monitor transfection efficiency. In addition, an unconjugated control siRNA can be used to test for specificity.

- ❑ **SignalSilence<sup>®</sup> siRNA duplexes** are designed, produced and purified in-house to meet the same stringent quality control standards as CST antibody products.
- ❑ **SignalSilence<sup>®</sup> siRNA duplexes** are functionally validated by assessing effective knockdown at the protein level.
- ❑ **Technical support** is provided by the same scientists who produce and validate the products and know them best.

For the most up-to-date product listing please visit our webpage:

[www.cellsignal.de](http://www.cellsignal.de)



#### SignalSilence<sup>®</sup> c-Myc siRNA

Confocal immunofluorescent analysis of HeLa cells, transfected with SignalSilence<sup>®</sup> Control siRNA (Unconjugated) #6568 (left) or transfected with SignalSilence<sup>®</sup> c-Myc siRNA I #6341 (right), using c-Myc (D84C12) XP<sup>™</sup> Rabbit mAb #5605 (green). Actin filaments have been labeled with DY-554 phalloidin (red).